

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Alena Bruhnová

VLIV SPÁNKU A ZVÝŠENÉ HLADINY KORTIKOSTERONU  
V HIPOKAMPU NA KONSOLIDACI TRAUMATICKÉ PAMĚTI  
U HLODAVCŮ

ROLE OF SLEEP AND ELEVATED INTRAHIPPOCAMPAL CORTICOSTERONE  
LEVEL IN CONSOLIDATION OF TRAUMATIC MEMORY IN RODENTS

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Eduard Kelemen, Ph.D.

Praha 2019

## **Prohlášení autora práce**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....  
Bc. Alena Bruhnová

## **Poděkování**

Chtěla bych touto cestou poděkovat svému školiteli, RNDr. Eduardu Kelemenovi, Ph.D., za uvedení do problematiky elektrofyziologie, teoretického i praktického zaučení, za cenné rady a za veškerý čas, který věnoval pro vypracování dané práce. Děkuji také za přijmutí do výzkumného týmu Experimentální biologie v Národním ústavu duševního zdraví. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům, Mgr. Ewě Szczurowské, Ph.D., Mgr. Čestmíru Vejmolovi a Dr. Rachel Horsley, BSc. (Hons), PG Cert, PhD, C Psychol, fHEA, za podporu a pomoc při programování a elektrofyziologickém zpracování dat. Dále také děkuji týmu laboratorních pracovníků za to, že se starali o zdraví pokusných zvířat. Chtěla bych poděkovat i Oddělení výzkumu spánku a paměti u zvířat na Univerzitě v Tuebingenu, jmenovitě Carlos Oyanedel a Marion Inostroza, Oddělení neurofyziologie paměti, jmenovitě Prof. RNDr. Aleš Stuchlík, DSc. a Mgr. Nikhil Ahuja, které mi poskytly cenné rady o metodice a designu experimentu. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za trpělivost a podporu v průběhu psaní této diplomové práce.

## Abstrakt

Jakékoliv narušení homeostázy organismu vyvolává stresovou reakci, která slouží k obnovení rovnováhy v těle. Hladiny stresových hormonů, např. glukokortikoidů, silně ovlivňují konsolidaci epizodické paměti závislé na hipokampu. Spánek má blahodárné účinky na jednotlivé typy paměti a je nezbytný pro správný průběh konsolidace nově nabytých informací. Málo je však známo o neuronálních procesech konsolidace paměti pro traumatickou událost. Tématem této práce je studium kombinace těchto dvou faktorů a zjištění vlivu vysokých hladin kortikosteronu a spánku na konsolidaci traumatické paměti u laboratorních potkanů.

Teoretická část této práce shrnuje poznatky týkající se paměti, spánku a stresu. Praktická část se zabývá experimentálním postupem, který kombinuje behaviorální (strachové podmiňování), elektrofyziologické metody (EEG nahrávání a určování spánkových stadií) a farmakologickou manipulaci (intrahipokampální administraci kortikosteronu). Souhrnně byl zjištěn vliv vysokých hladin kortikosteronu v hipokampu na konsolidaci kontextové paměti a na množství pomalých vln (slow wave sleep) v průběhu spánku. Tyto výsledky mohou přinést nové aspekty v problematice konsolidace traumatické paměti a s tím spojené posttraumatické stresové poruše.

Klíčová slova: spánek, konsolidace paměti, stres, kortikosteron, strachové podmiňování

## **Abstract**

Any disruption of homeostasis causes a stress response that serves to restore balance in the body. Stress hormone levels, such as glucocorticoids, strongly influence the consolidation of episodic memory dependent on the hippocampus. Sleep has beneficial effects on individual types of memory and is necessary for the proper course of consolidation of newly acquired information. Little is known, however, about neuronal processes of memory consolidation for a traumatic event. The topic of this work is to study the combination of these two factors and to determine the effect of elevated levels of corticosterone and sleep on the consolidation of traumatic memory in rats.

The theoretical part of this work summarizes the knowledge about memory, sleep and stress. The practical part deals with the experimental procedure combining behavioral (fear conditioning), electrophysiological methods (EEG recording and determination of sleep stages) and pharmacological manipulation (intrahippocampal administration of corticosterone). In summary, we found the effect of high levels of corticosterone in the hippocampus on contextual memory consolidation and on the amount of slow wave sleep. These results can bring new features in the field of traumatic memory consolidation and associated post-traumatic stress disorder.

**Keywords:** sleep, memory consolidation, stress, corticosterone, fear conditioning

## Obsah

1.	Úvod .....	10
2.	Literární přehled.....	12
2.1.	Paměť .....	12
2.1.1.	Kódování a konsolidace paměti .....	13
2.1.2.	Vyvolání vzpomínky.....	21
2.1.3.	Emoční paměť .....	21
2.1.4.	Epizodická a prostorová paměť.....	28
2.2.	Spánek a jeho vliv na paměť .....	31
2.2.1.	Slow wave sleep .....	33
2.2.2.	Rapid-eye movement sleep .....	35
2.3.	Glukokortikoidy a stres .....	36
2.3.1.	Osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny .....	36
2.3.2.	Receptory .....	40
2.3.3.	Vliv kortikosteroidů na některé mozkové oblasti .....	44
3.	Cíle diplomové práce.....	50
4.	Materiál a metody.....	50
4.1.	Behaviorální pokus.....	50
4.1.1.	Experimentální zvířata .....	50
4.1.2.	Design pokusu .....	51
4.1.3.	Metoda strachového podmiňování.....	53
4.2.	Elektrofyzologie.....	54
4.2.1.	Tvorba konektorů pro nahrávání EEG a EMG a intrahipokampálních kanyl.....	54
4.2.2.	Stereotaktická operace .....	55
4.2.3.	EEG nahrávání a vyhodnocování.....	56
4.3.	Farmakologie.....	58
4.3.1.	Intrahipokampální injekce.....	58
5.	Výsledky .....	59
5.1.	Spánek podporuje konsolidaci paměti pro kontext traumatické události.....	59
5.2.	Vysoká intrahipokampální koncentrace kortikosteronu zvyšuje množství SWS .....	62
5.3.	Intrahipokampální injekce kortikosteronu potlačují pozitivní účinky spánku pro kontext traumatické události .....	64
6.	Diskuze .....	68
6.1.	Možný vliv kortikosteronu na množství SWS .....	69
6.2.	Interakce mezi vlivem spánku a kortikosteronu při konsolidaci paměti pro prostorový kontext .....	70

6.3.	Signifikance studie pro problematiku PTSD .....	71
6.4.	Použití výsledků v dalším výzkumu .....	72
7.	Závěr.....	72
8.	Reference .....	73

## Seznam zkratek

ACC	anteriorní cingulární kůra	GRE	glucocorticoid response element
ACTH	adrenokortikotropní hormon	HPA	osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionový typ glutamátového receptoru	Hsp	heat shock protein
Arc	activity-regulated cytoskeletal-associated protein	LEA	laterální entorhinální oblast
AVP	arginin vazopresin	LTD	long-term depression (dlohodobá deprese)
BDNF	brain-derived nerve growth factor	LTM	long-term memory (dlouhodobá paměť)
BLA	bazolaterální jádro amygdaly	LTP	long-term potentiation (dlouhodobá potenciace)
BST	stria terminalis	MBH	mediobazální hypothalamus
CAMK(II)	Ca/kalmodulin dependentní kináza (typ II)	MEA	mediální entorhinální oblast
CS	conditioned stimulus (podmíněný stimulus)	MHL	major histocompatibility complex
CREB	cAMP response element binding protein	mPFC	mediální prefrontální kortex
CRH (CRF)	kortikotropin uvolňující hormon (faktor)	MR	mineralokortikoidní receptor
DH	dorzální hipokampus	MTL	mediální temporální lalok
DNA	deoxyribonukleová kyselina	NMDA	N-methyl-D-aspartátový typ glutamátového receptoru
dSub	dorzální subiculum	NSF	N-methylmaleimid senzitivní faktor
EAAR	excitatory amino acid receptor	PGO	ponto-genikulo-okcipitální hroty
EPSC	excitační postsynaptický proud	PKA	protein kináza A
EPSP	excitační postsynaptický potenciál	PKC	protein kináza C
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza	PKC $\gamma$	isoforma $\gamma$ protein kinázy C
fMRI	funkční magnetická rezonance	PKC $\zeta$	isoforma $\zeta$ protein kinázy C
GR	glukokortikoidní receptor	PKM $\zeta$	protein kináza M- $\zeta$
		PPT1	fosfatáza 1
		PRPs	plasticity-related proteins (proteiny podílející se na plasticitě)



PTSD	Posttraumatická stresová porucha	SWS	slow wave sleep (pomalovlnný spánek)
PVN	paraventriculární jádro	TLR	Toll-like receptor
RanGTP	GTP binding RAs-related nuclear protein	TNF	tumor necrosis factor (faktor nádorové nekrózy)
REM	rapid-eye movement	VP	vazopresin
REMS	rapid-eye movement sleep	vSub	ventrální subiculum
SR	Scavenger receptor		
STM	short-term memory (krátkodobá paměť)		

## 1. Úvod

V průběhu celého dne jsme schopni přijímat velké množství nových informací z okolního světa. Ty jsou buď ignorovány nebo zpracovávány (konsolidovány) dál do dlouhodobé paměti. Díky tomu se z labilních a dočasných vzpomínek stávají stabilní a dlouhodobé. Konsolidace může probíhat na několika úrovních – na buněčné (synaptické), nebo systematické. Pro správný průběh mechanismu konsolidace jsou velmi důležité některé mozkové oblasti, např. mediální temporální lalok nebo frontální kortex. Paměť můžeme rozdělit podle času na dlouhodobou a krátkodobou, nebo na deklarativní (explicitní, vědomou) a nedeklarativní (implicitní, nevědomou). Mezi podtyp deklarativní paměti patří i paměť kontextová, která je na hipokampu závislá (Cohen a Squire 1980). Důkazy důležitosti hipokampu a jeho vlivu na paměťové procesy byly poskytnuty prostřednictvím studií retrogradní amnézie (Squire, Slater a Chace 1975).

Spánek je stav, který je nutný k optimalizaci konsolidačních procesů. Spánkový cyklus, který znázorňujeme pomocí tzv. hypnogramu, je možné rozdělit na jednotlivé fáze, které se střídají: SWS (slow wave sleep, pomalovlnný spánek), REM (rapid-eye movement) a bdění. Během SWS dochází k reaktivaci a redistribuci na hipokampu závislé paměti a k jejímu přesunu díky synchronizaci hipokampálních a thalamokortikálních oscilací do dlouhodobého uložení, neokortexu. REM spánek je naopak charakteristický sníženou koherencí mezi limbickohipokampálními a thalamokortikálními obvody. Dochází k rozpojení jednotlivých paměťových systémů a k lokálním synaptickým změnám (Robertson 2009).

Některé nově nabyté informace mohou být dále zpracovávány s větší pravděpodobností než jiné. Jedná se např. o tzv. emocionálně zabarvené stopy – spojené s příjemnými, či naopak nepříjemnými stimuly (Ohman, Flykt a Esteves 2001). V modulaci emotivní paměti hraje důležitou roli amygdala (Hamann, a další 1999). Stres je součástí našich každodenních životů. Při stresové události dochází k vyplavení velkého množství stresových hormonů, mezi které patří i glukokortikoidy (kortikosteron u hlodavců a kortizol u lidí). Průběh konsolidace může být prostřednictvím vysokých koncentrací těchto hormonů modulován. U animálních modelů se k navození traumatické události používá metodika strachového podmiňování. Při jednoduchém asociativním strachovém podmiňování dochází ke spárování neutrálního stimulu (conditioned stimulus, tón, světlo)

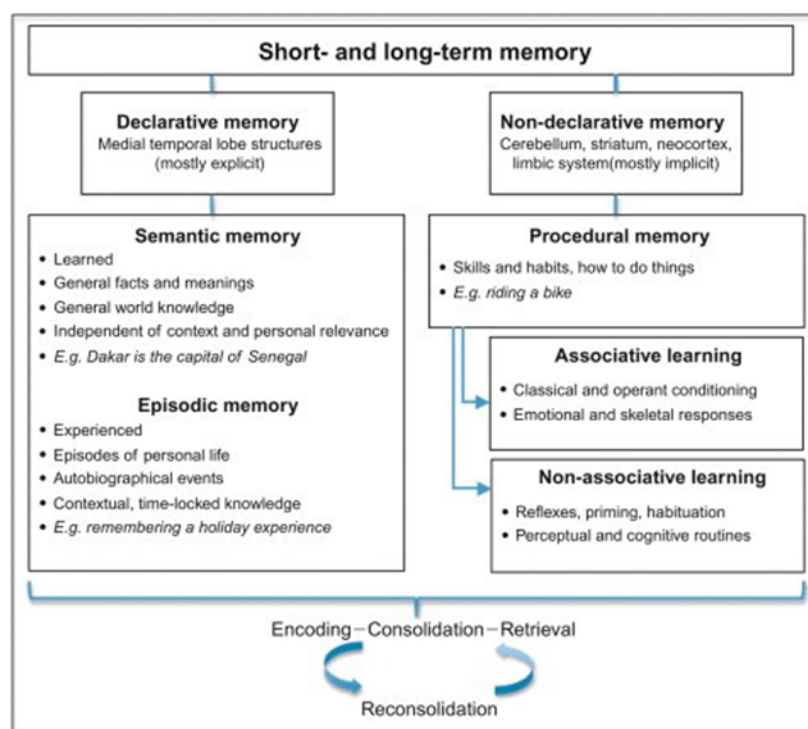
se stimulem averzním (unconditioned stimulus, elektrický šok). Výsledkem takového podmiňování je naučená strachová odpověď na neutrální stimulus – např. freezing, piloerekce nebo defekace. Při kontextovém strachovém podmiňování dochází ke spárování averzního stimulu s prostředím, kontextem (Bolles a Fanselow 1980). Existuje několik hypotéz, jakým způsobem se hipokampus podílí na podmiňování: může být součástí drah pro senzorické vstupy související s kontextovou informací (Rotenberg a Muller 1997), může působit při vzniku obranného chování (freezingu) (Young, Bohenek a Fanselow 1994), nebo se může podílet na formování strachové paměti (Phillips a LeDoux 1992).

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodu strachového podmiňování a metody nahrávání a vyhodnocování spánku u laboratorních potkanů do nové laboratoře, popsat vliv spánku a zvýšené intrahipokampální koncentrace kortikosteronu na konsolidaci paměti a zjistit změny chování s tím související.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Paměť

Paměť je kognitivní funkce, která dává možnost uchovávat a používat informace o předchozích zkušenostech. Můžeme ji rozdělit na určité podtypy buď podle časové dimenze, nebo specifické formy paměti či mechanismu získávání (obr. 1).



Obrázek 1 - Klasifikace odlišných typů paměti a procesů (Brem, Ran a Pascual-Leone 2013).

Velmi důležité bylo rozdělení paměti na deklarativní a nedeklarativní. Deklarativní paměť do sebe zahrnuje sémantickou a epizodickou paměť, je tvořena každodenními vědomými funkcemi (též explicitní paměť) a u amnestických pacientů je zpravidla narušena. Hlavními mozkovými oblastmi podílejícími se na správném fungování deklarativní paměti jsou struktury mediálního temporálního laloku (MTL). Nedeklarativní složka se skládá z paměti procedurální, případně i motorické a zahrnuje jakékoliv podvědomé podněty (pravidla, pohybové dovednosti, všeobecné znalosti) – implicitní paměť. Mozkové oblasti důležité pro správnou funkci této paměťové složky jsou cerebellum, striatum, koncový mozek a některé struktury limbického systému (Cohen a Squire 1980).

Podle času můžeme paměť také dělit na dlouhodobou (long-term memory, LTM) a krátkodobou (short-term memory, STM). STM je definována jako paměť udržující informace po dobu několika sekund a zahrnující vědomé udržování smyslových podnětů. LTM zahrnuje reaktivaci minulých zkušeností v čase od několika minut až po roky. STM a LTM jsou založeny na samostatných neuronálních mechanismech – zatímco při STM dochází k opakované excitaci neuronů, při LTM dochází ke strukturálním synaptickým změnám (Izquiero, a další 1999).

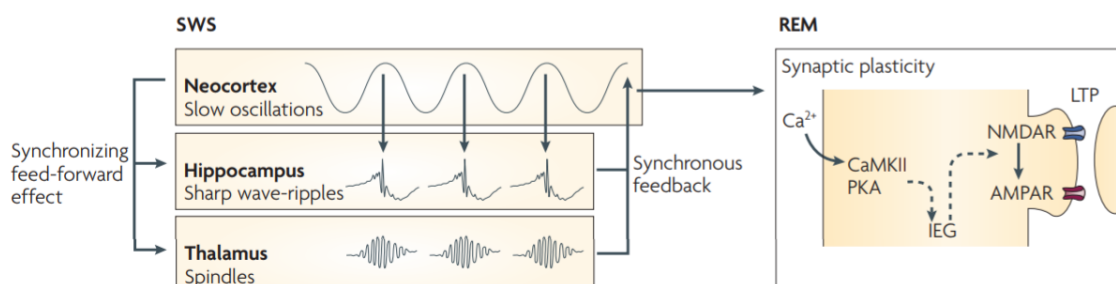
Proces paměti a učení zahrnuje v sobě mechanismy: kódování/vštěpování (acquisition), konsolidaci, uchovávání (retention) a vyvolání (retrieval) dané vzpomínky. Rozebereme si některé z jednotlivých kroků zvlášť.

#### 2.1.1. Kódování a konsolidace paměti

V průběhu celého dne konstantně přijímáme velké množství nových informací z okolního světa, ale i z vlastních myšlenkových procesů nebo fyzických výkonů. Informace jsou zpracovávány (nebo ignorovány) podvědomě. Některé informace mohou zaujmout více pozornosti (např. spojené s nepříjemným stimulem, náhlým velmi jasným světlem či hlasitým zvukem) – u takových událostí je větší pravděpodobnost, že budou dále zpracovávány. Proto mnoho studií, které se zabývaly kódováním paměti u hlodavců, bylo zaměřeno na strachové podmiňování, kdy se zjišťovala úloha hipokampu nebo amygdaly (více o tom v podkapitole věnované problematice strachového podmiňování). Mechanismy kódování závisí také na tom, zda daná informace je udržována v krátkodobé či dlouhodobé paměti. Krátkodobá paměť je omezená jak v kapacitě, tak i v délce trvání: limitované množství informace zůstane aktivní pouze po dobu několika minut až hodin. Navíc u krátkodobé paměti dochází ke kovalentním změnám už existujících proteinů (přes aktivaci neurotransmiterů a syntézu druhých poslů). Zda-li takové plastické změny budou zachovány, záleží na délce kovalentních modifikací substrátových proteinů a aktivitě enzymů zodpovědných za syntézu druhých poslů. U dlouhodobé paměti je potřeba zvýšená exprese genů a následná syntéza proteinů (Goelet, a další 1986).

Konsolidace je základním procesem tvorby dlouhodobé paměti. Během ní labilní a citlivá dočasná paměť je transformována na její stabilnější a dlouhodobější formu. O pojmu

„konsolidace“ se začalo mluvit v 90. letech 19. století (Lechner, Squire a Byrne 1999). Existují dvě hypotézy, jakým způsobem probíhá konsolidace paměti. Tyto dvě hypotézy se studovaly zvlášť, ale je důležité si uvědomit, že jsou společně součástí dynamického a nepřetržitého procesu.

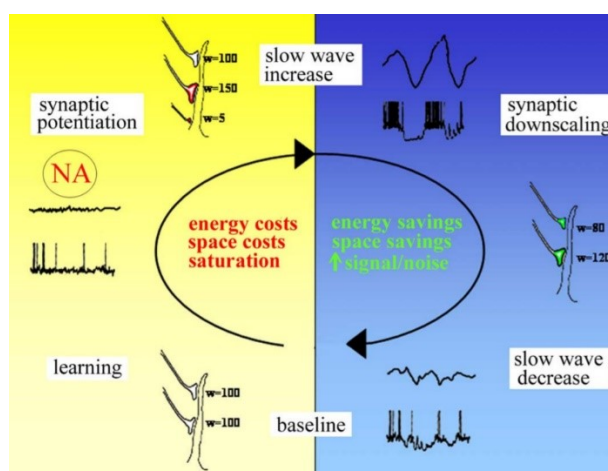


Obrázek 2 – **Hypotéza aktivní systémové konsolidace paměti.** Informace jsou kódovány v průběhu bdění v neokortexu i hipokampu. Pomalovlnný spánek (SWS) napomáhá opětovné aktivaci informací v hipokampu, hipokampální oscilace jsou synchronizovány s thalamokortikálními vřeténky a pomalými vlnami v kortexu. To umožňuje přenos nově nabytých informací do neokortexu (Diekelmann a Born 2010).

Hypotéza aktivní systémové konsolidace paměti (obr. 2) je založena na procesu reorganizace informací uložených v hipokampu a jejich přesunu do neokortexu takovým způsobem, že se nakonec tyto informace stávají na hipokampu nezávislé. Myšlenkou není, že by byla paměť doslova přenesena z hipokampu do neokortexu, v době učení v bdělém stavu jsou informace kódovány paralelně jak v hipokampu, tak i neokortexu. Během spánku (přesněji SWS) dochází k opětovné aktivaci a díky synchronizaci thalamokortikálních a hipokampálních oscilací dochází k vytváření stabilní dlouhodobé paměti (distribuce, propojení a zvyšování složitosti mezi vícero kortikálními vrstvami). Důkazy jsou poskytnuty studiemi retrográdní amnézie, kdy poškození hipokampu vede k amnézii pouze určitých časově dostupnějších vzpomínek (Squire, Slater a Chace 1975).

Hypotéza synaptické homeostázy je založena na rychlých posttranlačních změnách (poklesu množství) lokálních synapsí a strukturálních změnách v hipokampálních neuronálních sítích po získání informací. Kódování nových informací během bdělosti vede k posílení synapsí, v průběhu spánku pak dochází k redukci synaptické síly na udržitelnou energetickou úroveň, která opětovně umožňuje použití synapsí pro budoucí kódování. Dle studie (Vyazovskiy, a další 2008) u potkanů během bdělého stavu dochází k navýšení počtů AMPA receptorů obsahujících GluR1 podjednotku, a naopak během spánku dochází k jejich poklesu. Glutamát je také velmi důležitý pro konsolidaci a

jeho hladiny mohou být regulovány spánkovým rytmem, neboť při zaznamenávání jeho koncentrace se zjistil silný nárůst během bdění a REM spánku, naopak během SWS se jeho koncentrace snižovala. Koncentrace glutamátu se pozitivně korelovala s intenzitou SWS (Dash, a další 2009). Pomalé vlny vykazují také vysoké amplitudy na začátku spánku (obr. 3), kdy je synaptická síla vysoká (kvůli kódování informací před spánkem), postupně dochází ke snížení amplitudy v dalších cyklech SWS v důsledku synaptické depotenciace (Tononi a Cirelli 2006). O funkci spánku v průběhu konsolidace paměti se budeme také zabývat v příslušné kapitole.



**Obrázek 3 – Hypotéza synaptické homeostázy.** V průběhu bdění (žlutá část) přijímáme novou informaci, ta se pak ukládá, a tím dochází k zesílení některých synapsí pomocí dlouhodobé potenciace ( $w$  – síla synapse). Následně v průběhu spánku (modrá část) dochází k neuromodulačním změnám. Pomalé vlny mají na začátku spánku vysokou amplitudu a neurony jsou vysoce synchronizované. V průběhu SWS dochází ke snížení síly synapsí průměrně o 20 %, některé synapse jsou zcela odstraněny. Snížení synaptické síly vede i ke snížení amplitudy a synchronizace pomalých vln. Dochází ke snížení síly synapsí na základní úroveň. Po probuzení neuronální obvody zachovávají paměťovou stopu nabytých informací, a zároveň energetická náročnost se nachází zpět na základní úrovni, tudíž tento cyklus může začít znovu (Tononi a Cirelli 2006).

Už na konci 40. let vznikla Hebbovská teorie o posílení synapsi mezi jednotlivými neurony.

*„When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased.“* (Hebb 1949)

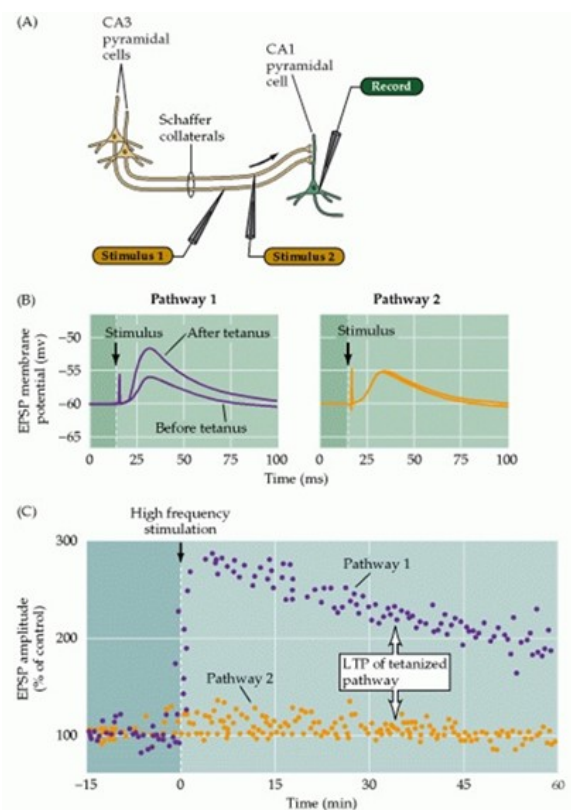
Dochází k neuronální depolarizaci a zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , který dokáže následně iniciovat molekulární signální kaskádu vedoucí k transkripci a translaci proteinů podílejících se na plasticitě (plasticity-related proteins, PRPs). PRPs následně indukují strukturální synaptické změny vedoucí k remodelování a zesílení synaptických

spojů. Na základě toho neurony mohou společně vytvořit tzv. neuronální ansámbl nebo engramy (neuronal ensembles/engrams). Termín „engram“ použil jako první Semon před více než 100 lety (1923). S pojmem Hebbovská synapse je úzce spjat pojem dlouhodobé synaptické plasticity – primárně dlouhodobá potenciace (long-term potentiation, LTP) /případně dlouhodobá deprese (long-term depression, LTD). Obě formy plasticity představují buněčné korelace učení a paměti.

#### 2.1.1.1. Dlouhodobá potenciace (LTP)

LTP byla poprvé popsána v hipokampální formaci králíků a její podstatou jsou rychlé a trvalé synaptické změny (Bliss a Lomo 1973).

Synaptické zesílení (obr. 4) se měří metodou intracelulárního nahrávání a zaznamenává se zvýšení amplitudy excitačního postsynaptického potenciálu (EPSP) nebo excitačního postsynaptického proudu (EPSC).



Obrázek 4 - Dlouhodobá potenciace synapse mezi Schafferovými kolaterálami a CA1 oblastí hipokampu. A - uspořádání elektrod pro nahrávání synaptického přenosu. B - synaptické odpovědi zaznamenané z oblasti CA1 v reakci na jednotlivé stimuly. Lze pozorovat změnu odpovědi vlivem vysokofrekvenční stimulace. C- časový průběh změn amplitudy EPSP (Purves, a další 2001).



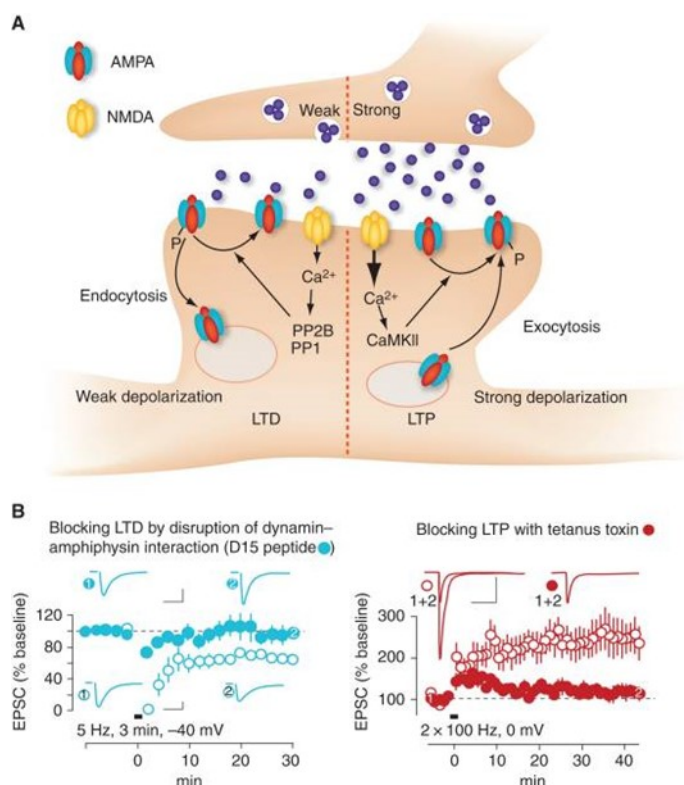
Pro správnou funkci dlouhodobé plasticity jsou zapotřebí glutamátové receptory typu NMDA (N-methyl-D-aspartátového) a AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionového). Při použití antagonisty NMDA receptoru dochází k blokování vzniku LTP (Harris, Ganong a Cotman 1984). NMDA i AMPA receptory patří mezi skupinu ionotropních receptorů, jsou propustné převážně pro  $\text{Na}^+$  (v případě NMDA i pro  $\text{Ca}^{2+}$ ). Při otevření dochází k depolarizaci a vtoku iontů. Receptory se primárně nachází na postsynaptických zakončeních (výjimečně na presynaptických) a podílí se tam na regulaci signalizace (Dingledine, a další 1999).

Průběh LTP lze rozdělit na několik fází. K iniciaci LTP je nutná vysokofrekvenční stimulace (50-100 Hz po dobu 1 s) nebo salva akčních potenciálů, masivní aktivace presynaptických neuronů a následný výlev glutamátu. Na NMDA receptor se musí navázat molekuly glutamátu, aby došlo k otevření ligandem řízených vrátek, a současně musí dojít k uvolnění molekuly  $\text{Mg}^{2+}$  z oblasti iontového kanálu v důsledku depolarizace postsynaptické membrány (tetanická stimulace je dostatečně silná, aby k tomu došlo), k jeho otevření do stavu vodivosti cca 50 pS a toku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů dovnitř (Jahr a Stevens 1987).

LTD je iniciována aktivací presynaptických neuronů při nízkých frekvencích (1-3 Hz po dobu 5-15 min). Výsledkem je jen velmi mírná postsynaptická aktivita. Přesto však dochází k vtoku vápníku dovnitř do buňky i během nízkofrekvenční stimulace, hnací síla pro vstup je velmi vysoká. I během LTD dochází k aktivaci NMDA receptorů, ale ve velmi malém množství, které není dostatečné k vyvolání LTP (Dudek a Bear 1992). Zvýšená intracelulární koncentrace vápenatých iontů je nezbytná pro iniciaci LTP (Dunwiddie a Lynch 1979), neboť slouží jako druhý posel i kofaktor k translokaci (např. protein kinázy C z cytosolu do membrány (Akers, a další 1986)) nebo aktivaci enzymů, např.  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin dependentní protein kináza (CAMK), cAMP-dependentní protein kináza, atd. (Schwartz a Greenberg 1987).

V hipokampu mladých zvířat se nachází také synapse, které na svých postsynaptických membránách obsahují pouze NMDA receptory. Po aplikaci LTP se tyto synapse stávají funkčně aktivní díky vložení AMPA receptorů na jejich povrch (Isaac, Nicoll a Malenka 1995). Naopak při LTD dochází ke snížení celkového počtu AMPA receptorů na povrchu membrány. AMPA receptory jsou tedy velmi mobilní, dochází k jejich recyklaci

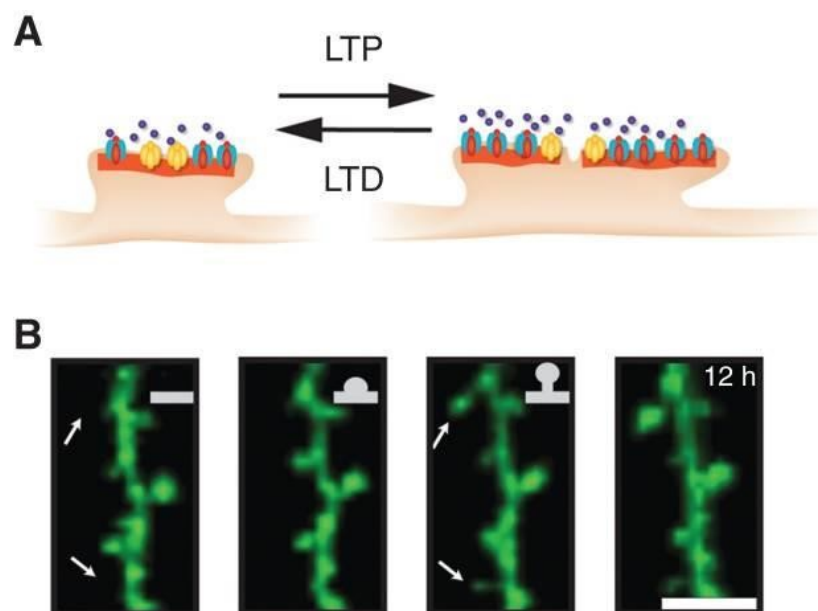
z membránového povrchu do cytoplasmy a naopak (Luscher, a další 1999). Jak ale k takovým přesunům dochází? Jak bylo zmíněné dříve, vnitrobuněčné ionty  $\text{Ca}^{2+}$  působí na různých úrovních (obr. 5). Jedním z nejdůležitějších mechanismů je aktivace CAMKII prostřednictvím zvýšené vnitrobuněčné koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů způsobenou LTP (Schwartz a Greenberg 1987).



Obrázek 5 - **Postsynaptické mechanismy exprese LTP a LTD.** Masivní aktivita na postsynaptické membráně vede k aktivaci velkého množství NMDAR a vstupu vápenatých iontů dovnitř buňky, což spouští další signální kaskády prostřednictvím CAMKII, které vedou k exocytóze AMPAR a k celkovému zvýšení jejich počtu na buněčném povrchu. Naopak slabá aktivace vede pouze k mírné depolarizaci, to přednostně aktivuje fosfatázy, které defosforylují aktivní AMPAR na membránovém povrchu a podporují tím jejich endocytózu. Celkový počet AMPAR tím klesá (Luscher a Malenka 2012).

Prostřednictvím LTP tedy dochází ke zvýšení fosforylační aktivity CAMKII, taková nízkofrekvenční depolarizace membrány, jakou můžeme pozorovat při LTD, nevede k podobným výsledkům (Fukunaga, a další 1993). Tento krok vede k fosforylaci velkého množství proteinů i AMPA receptorů (Barria, a další 1997). Fosforylace vede jednak ke zvýšení vodivosti AMPA receptorů (Benke, a další 1998) a jednak k jejich inzerci na membránový povrch (Ehlers 2000).

Na rozdíl od LTP LTD zahrnuje aktivaci fosfatáz (např. fosfatáza 1, PPT1) namísto protein kináz (Mulkey, Herron a Malenka 1993). NMDA-dependentní LTD je regulována kalcineurinem, neboť má vyšší afinitu pro Ca/kalmodulin, než CAMKII (Lisman 1989).

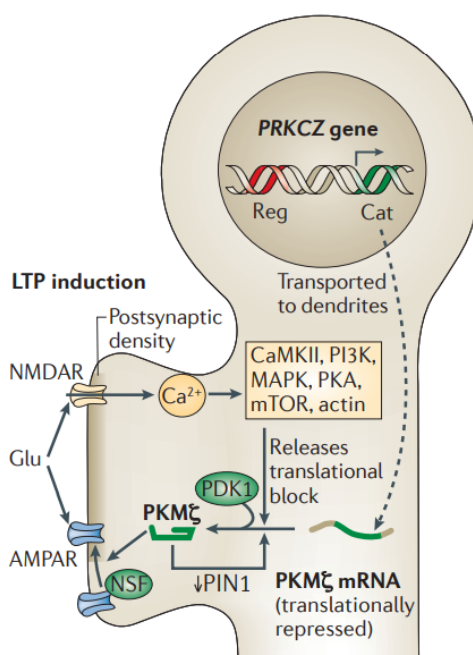


Obrázek 6 - **Obousměrná morfologická plasticita dendritických trnů** bezprostředně po iniciaci LTP nebo LTD (A). Iniciace LTP vede také ke vzniku nových dendritických trnů (B) (Luscher a Malenka 2012).

LTP probíhá preferenčně na synapsích s menší dendritickou denzitou, protože po indukci bylo zjištěno zvýšení synaptické potenciace (např. zvětšení dendritických trnů). Velké dendritické trny jsou i proto odolnější vůči iniciaci LTP. Je to důležité pro správné ukládání paměťových stop, aby jednotlivé vzpomínky byly chráněny před dalším zesílením kvůli tvorbě nové paměti (Matsuzaki, a další 2004). V důsledku LTP dochází ke tvorbě segmentované perforované synapse, což může představovat fázi membránové expanze. Tento proces je reverzibilní a, buď může docházet k tvorbě dendritických trnů, nebo k duplicitě již existujících trnů. Takové změny během udržovací a pozdní fáze LTP logicky souvisí s nárůstem síly synapse (Toni, a další 2001). Naopak těsně po LTD dochází ke zpomalení růstu dendritických trnů, až k jejich úplnému zakrnění (Nagerl, a další 2004) (obr. 6).

Kromě strukturálních a morfologických změn dochází také pro udržení LTP ke změnám spojenými se syntézou proteinů. Protein kináza A (PKA), CaMK, protein kinasa M- $\zeta$  (PKM $\zeta$ ) a extracelulární signálem regulovaná kináza (ERK), stejně jako jiné signalizační molekuly

iniciují proteinovou syntézu lokálně v dendritech prostřednictvím mRNA nebo jaderné transkripce. PKM $\zeta$  je nezávislá katalytická doména isoformy  $\zeta$  protein kinázy C (PKC $\zeta$ ) bez inhibiční (regulační) podjednotky vzniklá z PKM $\zeta$  mRNA (Hernandez, a další 2003). Je tedy aktivní i v nepřítomnosti druhých poslů, zvyšuje počet postsynaptických AMPA receptorů (obr. 7) (Ling, Bernardo a Sacktor 2006).



Obrázek 7 - **Formace PKM $\zeta$  v průběhu LTP.** Geny PKC $\zeta$  mají dva promotory – jeden kóduje regulační a druhý katalytickou doménu. PKM $\zeta$  je tedy přepisována do mRNA bez regulační podjednotky, mRNA PKM $\zeta$  je transponována do těla dendritů, kde je její translace potlačena PIN. Během LTP dochází k fosforylaci a aktivaci translace. PKM $\zeta$  poté iniciuje pozitivní zpětnovazebnou smyčku tím, že inhibuje PIN1, dochází tedy k aktivní translaci a vzniku dalších molekul PKM $\zeta$ , aby se v těle dendritů udržela její vysoká koncentrace. PKM $\zeta$  následně potencuje odpověď AMPAR skrz zvýšení celkového počtu AMPAR na postsynaptické membráně působením NSF (N-methylmaleimid senzitivní faktor) (Sacktor 2011).

Jak tedy PKM $\zeta$  působí na paměť? Během LTP dochází k fosforylaci AMPA receptorů, přesněji v místě GLUR2 podjednotky, která tvoří heterodimery s podjednotkami GLUR1 nebo GLUR3. Mimo synapse jsou AMPA receptory udržovány vazbou na PICK1, pro jejich uvolnění je zapotřebí vazby s GLUR2 (Yao, a další 2008). Kromě PICK1 PKM $\zeta$  interaguje i s NSF (N-methylmaleimid senzitivní faktor), a tím dochází k jeho upregulaci. PKM $\zeta$  udržuje dlouhodobé vzpomínky blokováním kaskády závislé na GLUR2, která se snaží zpětně odstranit postsynaptické AMPA receptory, aby se dosáhlo trvalého zvýšení jejich koncentrace na membráně (Migues, a další 2010). PKM $\zeta$  může také trvale přispívat i k ukládání a udržení paměťových stop v dlouhodobé paměti. Prostorový trénink vyvolává

zvýšení koncentrace PKM $\zeta$  v dorzálním hipokampu. Toto zvýšení přetrvává od konce tréninku až nejméně měsíc po něm (Hsieh, a další 2017).

Další neméně důležitý je transkripční faktor CREB (cAMP response element-binding protein). Bylo zjištěno, že jeho fosforylovaná forma pozitivně ovlivňuje průběh konsolidace dlouhodobé paměti (Kaleem, a další 2011).

I když většina studií se zaměřuje na mechanismy a funkce LTP/LTD na excitačních synapsích, synaptickou plasticitu lze pozorovat i na inhibičních GABA-ergních synapsích, tzv. I-LTP/I-LTD. Změnou excitační/inhibiční rovnováhy může docházet prostřednictvím GABA-ergních synapsí k regulaci excitability, čímž znatelně přispívá k zdokonalení učení a paměti (Castilio, Chiu a Carroll 2012).

#### 2.1.2. Vyvolání vzpomínky

Studie o vyvolání vzpomínek v savčím mozku předpokládají, že tento proces zahrnuje reaktivaci (rekonstrukci) vzoru neurální aktivity spojeného s danou vzpomínkou. Dle studie amnestických pacientů pro vyvolání nově vytvořených krátkodobých vzpomínek jsou zapotřebí neuronálních obvodů hipokampu (Squire a Zola-Morgan 2015). Podle teorie systémové konsolidace ale po několika týdnech či měsících dochází k přesunu informací do kortexu, kde už jednotlivé paměťové stopy nejsou závislé na hipokampu.

Na buněčné úrovni je prokázáno, že pro správné vyvolání vzpomínky nejsou zapotřebí NMDA receptory (které ale hrají důležitou roli při kódování a ukládání informace). Blokování NMDA receptorů v hipokampu nemají na vyvolání prostorové paměti žádný signifikantní vliv (Steele a Morris 1999). Podobně tak je prokázán i vliv PKC a PKA (Goosens, Holt a Maren 2000).

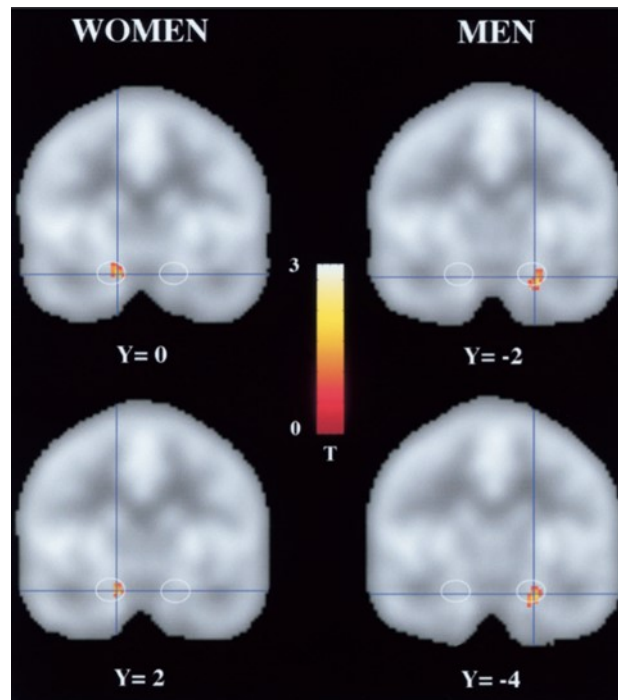
#### 2.1.3. Emoční paměť

Emoce (z lat. „emovere“- vzrušovat) jsou psychicky a sociálně konstruované procesy, zahrnující subjektivní zážitky, libosti a nelibosti, provázené fyziologickými změnami (změna srdečního tepu, změna rychlosti dýchání atd.), motorickými projevy (mimika, gestikulace), změnami pozornosti a soustředěnosti. Hodnotí skutečnosti, události, situace a výsledky

činností podle subjektivního stavu a vztahu k hodnocenému, vedou k zaujetí postoje k dané situaci (Wikipedia 2018).

Stále nevyřešeným problémem v neurovědě je, jakým způsobem mohou být emoce začleněné do činnosti nervového systému. Existuje několik hypotéz, ta první tvrdí, že jednotlivé emoční stavy (kategorie) odpovídají konkrétním oblastem v mozku. Vedoucí hypotéza tohoto přírodního modelu emoce spočívá v tom, že některé kategorie emocí („hněv“, „strach“, „štěstí“, „smutek“, „znechucení“) jsou základní a zděděné. Každá z těchto kategorií vyvolává odlišné koordinované změny v senzorických, motorických a fyziologických funkcích, které lze změřit (Barrett 2006). Druhá hypotéza je založená na tom, že základem pro jednotlivé emoční stavy jsou tzv. okruhy, které nejsou specifické pro určité oblasti mozku a prochází jimi naskrz. V dnešní době se spíše přikláníme ke druhé hypotéze: soubor interaktivních oblastí mozku, které se běžně podílejí na základních psychologických operacích emocionální i neemotivní povahy, je aktivní během emočních zkušeností a vnímání v celé řadě diskrétních emocionálních kategorií (J. E. LeDoux 1993).

Amygdala je velmi důležitá v modulaci emotivní paměti, ať už se jedná o negativní emoční stavy (např. strach) nebo pozitivní (vzrušení) (Hamann, a další 1999). Ke strukturám, které se kromě amygdaly podílí na kódování negativních emočních prožitků, patří také frontální kortex (gyrus frontalis inferior, gyrus frontalis medialis) a insula. Vyšší aktivity při kódování pozitivních emočních prožitků byly zaznamenány i v oblasti gyrus cingularis (Canli, a další 1999). Pravý a levý amygdalový komplex může působit odlišně v závislosti na pohlaví (obr. 8). U mužů dochází k signifikantně vyšší mozkové aktivitě v pravé amygdale u emočně zabarvených úkolů (Cahill, a další 1996), zatímco u žen je to naopak a jsou zaznamenány vyšší mozkové aktivity v levé amygdale (Cahill, Haier a White, a další 2001).

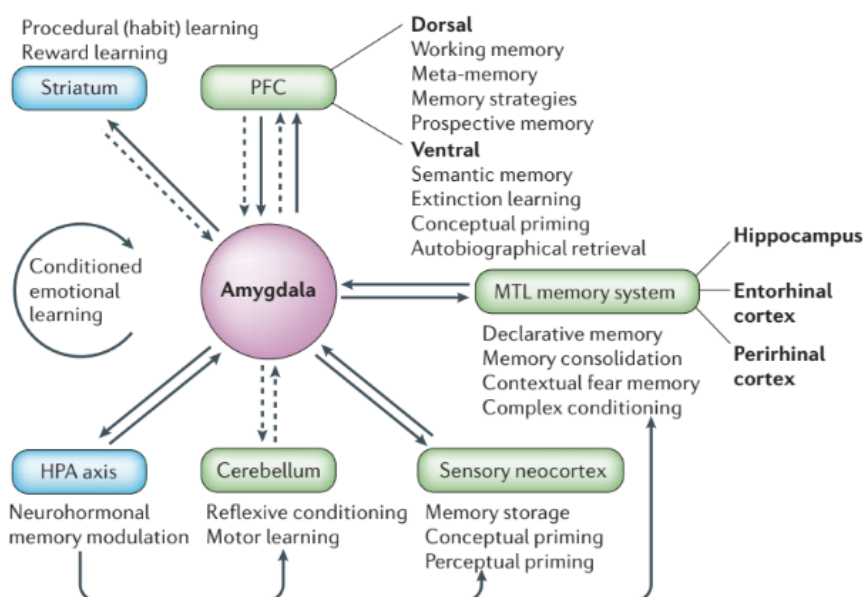


Obrázek 8 - **Porovnání mozkové aktivity amygdalového komplexu žen a mužů.** Bílý kroužek značí orientační oblast amygdaly. Hodnoty Y odpovídají posteriorní/anteriorní souřadnici příslušného řezu, převzaté z atlasu Talairach a Tournoux (1988). (Cahill, Haier a White, a další 2001)

Amygdala je také nejdůležitějším sídlem procesů zpracování emočních informací nezávisle na způsobu prezentace (Tabert, a další 2001), bez ní nejsou možné žádné emoční účinky na paměť. Díky této struktuře dochází k filtraci informací, které jsou pro jednotlivce relevantní (Babinsky, a další 1993). Může taky modulovat paměť zvýšením aktivity jiných oblastí mozku (shrnutí je na obr. 9), které se účastní paměťových procesů (např. hipokampus) (Krettek a Price 1978).

Interakce emocí a paměti se vyskytují v různých fázích zpracovávání informací, časový průběh procesů spojených s prožitím emotivních událostí je následující: vytváří se počáteční reprezentace paměti, následně průběh konsolidace (postencoding processes) může i nadále ovlivňovat reprezentaci paměťových stop. Amygdala reguluje konsolidaci dlouhodobé paměti, ne krátkodobé; také může modulovat včasné zpracování vizuálních informací v okcipitální kůře (Tabert, a další 2001). Studie pomocí funkční magnetické rezonance (fMRI) a retrográdního značení ukázala, že amygdala projikuje do všech rostro-kaudálních úrovní sensorických regionů v kortexu podílejících se na zpracování vizuálních podnětů (Amaral, Behnia a Kelly 2003). Amygdala reaguje na emoční podněty s jakousi automaticitou, tudíž velmi rychle i bez uvědomění (Whalen, a další 1998). Pomoci

zpětnovazebných drah by se následně mohla amygdala podílet na posílení percepce kódované emoční události (Davis a Whalen 2001).



Obrázek 9 - Shrnutí přímého propojení mezi amygdalou a jinými oblastmi mozku zodpovědnými za paměťové procesy (LaBar a Cabeza 2006).

V oblasti mediálního temporálního laloku (MTL) se kromě amygdaly nachází také hipokampus, oblast zodpovědná za ukládání mj. deklarativní a epizodické paměti. I přesto, že jsou to oddělené nezávislé systémy, je zřejmé, že spolu interagují. Není překvapující, že emocionálně zabarvené paměťové stopy jsou mnohem odolnější proti zapomenutí než emočně neutrální vzpomínky. Už během kódování paměťové stopy je prokázáno, že emoce mohou ovlivnit pozornost a zpracování podnětů (Ohman, Flykt a Esteves 2001). Rozhodující roli v modulaci paměti hraje amygdala v průběhu konsolidace, kdy má vliv na posílení na hipokampu závislé emočně zabarvené paměti, neboť nově vznikající paměťové stopy jsou poněkud náchylnější k narušení (Packard, Cahill a McGaugh 1994). Modulace konsolidace může probíhat působením stresových hormonů (např. adrenalinu, noradrenalinu, glukokortikoidů) (Gold a Van Buskirk 1975), které aktivují  $\beta$ -adrenergní receptory v bazolaterální amygdale (Clark, a další 1998). Podobných výsledků bylo dosaženo při studiích pomocí zobrazovacích metod (fMRI). Navíc bylo zjištěno, že u pacientů s patologií v levé amygdale se objevoval i nižší stupeň aktivity v levém hipokampu a že tato závislost je reciproká, při patologiích v levém hipokampu se objevoval nižší



stupeň aktivity i v levé amygdale. S tím byly spojené i horší výsledky v testu emočně zabarvených slov (Richardson, Strange a Dolan 2004).

#### 2.1.3.1. *Strachové podmiňování*

Jednoduché (asociativní) a kontextové strachové podmiňování patří mezi modely, díky kterým lze zkoumat neurobiologické mechanismy učení a paměti a porozumět jejím pochodům.

Během jednoduchého asociativního strachového podmiňování dochází ke spárování emocionálně neutrálního podmíněného stimulu (z aj. conditioned stimulus, CS) se stimulem averzním nepodmíněným (z aj. unconditioned stimulus, US). Jako CS se většinou používá světlo nebo tón a US je obvykle elektrický šok (tzv. footshock). Výsledkem takového podmiňování je vyvolání reakce na CS jako na ohrožující, např. tón, který byl před tím spárován s elektrickým výbojem vyvolávajícím reakci jako je freezing (zmrazení, nehybnost zvířete), defekaci, piloerecti aj. Takové reakce na CS před spárováním s US nejsou pozorovány – jedná se tedy o naučené podmíněné emoční reakce. Na rozdíl od toho kontextuální strachové podmiňování je založeno na spárování US a kontextuálních podnětů (prostředí). Při testování dochází k reakci na prostředí obdobně jako na CS při jednoduchém podmiňování (Bolles a Fanselow 1980). Přestože emocionální odpověď a reakce vyvolané jak kontextuálním, tak jednoduchým strachovým podmiňováním jsou velmi podobné, ke zpracování informace dochází odlišně.

Hlavní mozkové oblasti, které se zdají být nejvíce zapojeny u strachového podmiňování jsou amygdala, hipokampus, frontální kortex a cingulární korová oblast.

Amygdala hraje zásadní roli ve vzniku, uchovávání a následném vyjádření chování podmíněné strachové odpovědi. Při studiu účinků elektrolytických a neurotoxických lézí jednotlivých jader amygdaly se zjistilo, že na procesech podmiňování se podílí hlavně laterální a centrální jádra (Goosens a Maren 2001). U potkanů s lézemi v těchto oblastech nedocházelo k tak signifikantním reakcím na CS při jednoduchém asociativním podmiňování. Laterální jádro se zdá být místem, kde dochází ke vstupu informace o CS do amygdaly (LeDoux, a další 1990), centrální jádra jsou zodpovědná za motorické výstupy vedoucí k odpovídající reakcím na CS či kontext (LeDoux, Iwata, a další 1988). Názory na

funkci bazolaterálních jader amygdaly při strachovém podmiňování jsou rozdílné. Studie z roku 2000 (Amorapanth, LeDoux a Nader) demonstruje, že elektrolytické léze v této oblasti nemají vliv na odpověď na CS. Jiné studie tvrdí, že bazolaterální jádra nejsou nezbytná pro formování a expresi dlouhodobé explicitní paměti při kontextuálním strachovém podmiňování, neboť zvířata s lézemi v bazolaterální oblasti sice reagovala méně na kontext (menší množství freezingu), avšak si to místo pamatovala (např. vstupovala méně do ramena bludiště, kde šok obdržela) (Vazdarjanova a McGaugh 1998). Podobného výsledku bylo dosaženo i v dalších studiích. Rozdílné výsledky mohly být způsobeny umístěním lézi, kdy v posteriorní části bazolaterálního jádra nevykazovala žádný signifikantní efekt, zatímco léze v jeho anteriorní části ano (Goosens a Maren 2001).

Důležitost amygdaly při strachovém podmiňování byla potvrzena nejen u zvířat, ale i u lidí (LaBar, a další 1995). Navíc další zajímavosti jak u lidí (Furmark, a další 1997), tak i u zvířat (Coleman-Mesches a McGaugh 1995) je, že pravá amygdala hraje důležitější roli v průběhu strachového podmiňování.

Existuje několik hypotéz, jakým způsobem se hipokampus podílí na podmiňování. Může být důležitým článkem pro vizuální, sluchové, čichové či jiné senzorycké vstupy. Studie místových buněk (tzv. place cells) potvrzují při nejmenším hipokampální procesy související s vizuální prostorovou informací (Rotenberg a Muller 1997). Hipokampální léze po tréninku způsobují u zvířat zhoršení odpovědi při strachovém podmiňování. Dochází k poškození smyslového zpracování v průběhu testování (Young, Bohenek a Fanselow 1994). Pokud však byly hipokampální léze provedeny v průběhu delšího časového intervalu po tréninku (až 28 dní), byla u zvířat kontextová strachová odpověď zachována (Kim a Fanselow 1992). Je tedy zřejmé, že, pokud je prodleva mezi tréninkem a lézí dostatečně velká, kontextová strachová paměť se stává na hipokampu nezávislá.

Hipokampus také může působit při vzniku obranného chování (např. freezingu), neboť při jeho lezích dochází ke změnám nejen při strachovém podmiňování, ale také v chování v otevřeném prostoru (open field) (Young, Bohenek a Fanselow 1994). Studie z roku 2002 naznačuje zapojení hipokampálních GABA receptorů při učení. Podávání inverzního agonisty GABA receptorů, RY024, způsobuje vznik strachové odpovědi ještě před tím, než zvířata dostávají elektrický šok (Bailey, a další 2002).

Poslední hypotézou je, že hipokampus patří k paměťovým strukturám podílejícím se na formování strachové paměti. Kontextová paměť vyžaduje vstupy z hipokampu, zejména z jeho dorzální oblasti a CA3. Bylo zjištěno, že léze dorzálního hipokampu (DH) vedou ke zhoršení získání odpovědi (freezingu) na kontextové podněty, ne však na CS při jednoduchém podmiňování (Phillips a LeDoux 1992). Zajímavým faktem je ale to, že záleží na tom, zda byly léze DH vytvořeny před nebo po tréninku. Zatímco ty druhé opravdu způsobují retrográdně deficit reakci na kontext, léze vytvořené alespoň týden před tréninkem nemají na kontextové strachové podmiňování žádný vliv (Maren, Aharonov a Fanselow 1997). Navíc dle této studie došlo i k ovlivnění reakci na CS při asociativním podmiňování u obou druhů lézi v různých časových intervalech od tréninku. Společně vzato tyto výsledky naznačují, že neurony z oblasti DH nejsou nezbytně nutné pro získání a naučení kontextového podmiňování. Normální průběh získání a vyvolání kontextové odpovědi u potkanů s neurotoxickými lézemi způsobenými před tréninkem může být zprostředkován asociací unimodálních podnětů v kontextu (v podstatě CS). Takový systém není tolik závislý na hipokampu (Maren, Aharonov a Fanselow 1997). Vliv DH lézi na odpověď na CS (tón) lze vysvětlit tím, že samotná reakce nebyla naučená asociace CS-US (tón-šok), ale že samotný tón potkanům připomíná kontext, který je s US spárován. Takové podmiňování už lze označit jako kontextové, a tudíž je závislé na hipokampu (Quinn, a další 2002).

I přes to, že spousta studií strachového podmiňování potvrzují primárně důležitost dorzální části hipokampu, ukázalo se, že i jeho ventrální část hraje roli při strachovém vnímání. Léze v této oblasti sice nenarušují kontextové podmiňování ani prostorovou orientaci, ale mohou mít vliv na některé typy obranného chování souvisejícího se strachem (Kjelstrup, a další 2002).

Studie u lidí poskytují též jasný důkaz o úloze hipokampu při kontextovém strachovém podmiňování. Navíc v období očekávání šoku se projevuje aktivita insuly a oblasti ACC (anteriorní cingulární kortex) (Marschner, a další 2008).

Neokortex je dalším místem, kde dochází k ukládání kontextové paměti. Na rozdíl od hipokampu se však jedná o paměť dlouhodobou. Hipokampus je ideální pro rychlé učení, které je potřebné při kontextovém strachovém podmiňování. Pokud ale je hipokampus

inhibován před tréninkem, neokortex přebírá jeho funkci a dochází k ukládání kontextové paměti (O'Reilly a Rudy 2001).

#### 2.1.4. Epizodická a prostorová paměť

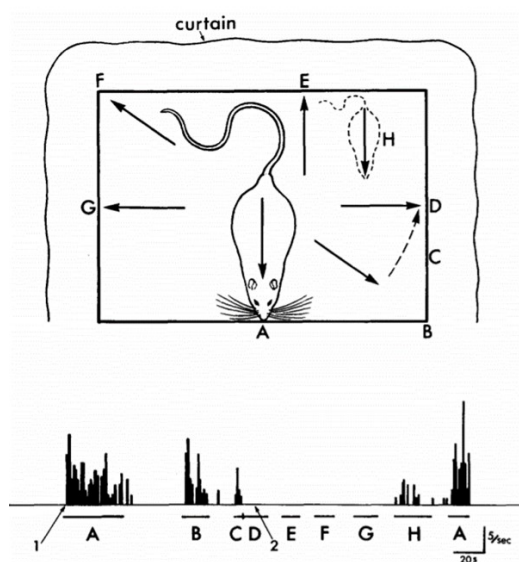
Epizodická paměť nám dává možnost učit se, ukládat a vyvolávat jedinečné osobní zkušenosti, které většinou zahrnují informace o podnětu, čase a místě (kontextu).

Na epizodické paměti se podílí např. mPFC (Favorik, a další 2008), hlavně na rozpoznávání určité informace a vyvolání specifických epizodických vzpomínek. Výstupy z mezokortikálních oblastí jsou vedeny do hipokampu přes parahipokampální zónu, propojenou část MTL okolo hipokampu. Daná oblast zahrnuje např. perirhinální, parahipokampální a enthorhinální kortex. Jednotlivé části dostávají informaci prostorovou i neprostorovou, ty jsou separovány, dokud se nepředají dále do hipokampu (Burwell a Amaral 1998). Jak už bylo zmíněno v předešlé podkapitole o strachovém podmiňování, rozsáhlé studie o hipokampálních lézích potvrzují jeho kritické zapojení do zpracování kontextové paměti. Z parahipokampální oblasti projikují do hipokampu dráhy přes LEA (laterální enthorinální oblast) a MEA (mediální entorhinální oblast). Terminály projikujících drah končí v oblastech CA3 a gyrus dentatus nebo CA1 a subiculum (Witter, a další 2000). Tyto vazby mohou být po učení posíleny skrz reaktivaci určitých smyček a spojení vedoucích přes hipokampus a tyto dráhy vedou k postupné konsolidaci paměti do kortikálních oblastí (Eichenbaum, a další 1999).

Kontext lze obecně definovat jako konstantně přítomné pozadí (tzv. background cues). Zvířata jsou schopná si zapamatovat specifický kontext, ve kterém zažila nějaký specifický podnět (např. odměna – jídlo; elektrický šok) – kombinace „co“, „kde“ a „kdy“. Potkani s poškozeným hipokampem mají problém kombinovat všechny tři části dohromady (Ergorul a Eichenbaum 2004). Hipokampální plasticita je nezbytná pro kombinaci těchto stimulů – při inhibici NMDA receptorů v hipokampu dochází také ke zhoršení výkonu u potkanů při testování kombinace „co“ a „kde“ (Day, Langston a Morris 2003). Úloha hipokampu ale spočívá také v tom, že dokáže stejné prostředí od sebe odlišit nejen na základě kontextuálních rozdílů, ale i na základě úlohy, kterou musí zvířata v daném prostředí splnit. Zjistilo se, že dochází ke vzniku naprosto odlišného vzoru pálení buněk

(tzv. firing pattern) v závislosti na úkolu, i když prostředí zůstává stejné (Smith a Mizumori 2006).

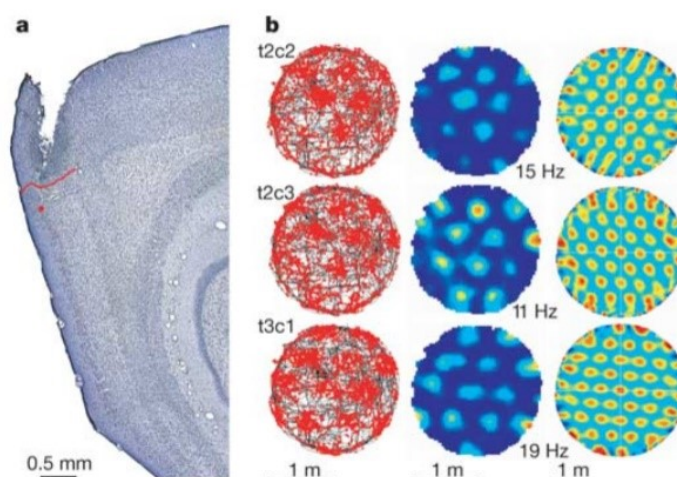
Mnoho hypotéz a postřehů týkajících se (nejen) epizodické paměti u lidí bylo generováno studii jednoho z nejznámějších neurologických pacientů všech dob, H. M. Díky němu byla potvrzena kritická úloha MTL, a to spustilo kaskádu rychlého vývoje neinvazivních široce dostupných neuroimagingových technik (Squire 2009). Díky kombinaci animálních a lidských studií existuje několik teorií ukládání epizodické paměti. Jedna z nich, tzv. deklarativní teorie, navrhuje, že starší vzpomínky jsou konsolidovány do neokortikálních oblastí mimo MTL a postupem času jsou tedy na MTL nezávislé. Proto pacienti s poškozeným hipokampem či přilehlými oblastmi nedokáží získat nové epizodické vzpomínky, zatímco stará fakta ohrožená nejsou. Jiná teorie, tzv. Multiple Trace Theory, je založena na domněnce, že jak nové, tak i časově starší epizodické vzpomínky stále závisí na hipokampu. Hipokampus a parahipokampální oblast ukládají paměťové stopy, které jsou také uloženy i do neokortexu. Pokaždé, když dochází k vyvolání určité vzpomínky, vzniká v hipokampu nové propojení, smyčka – tudíž staré vzpomínky mají těchto spojů více, proto jsou méně náchylné k narušení (zapomnění) (Steinvorth, Levine a Corkin 2005).



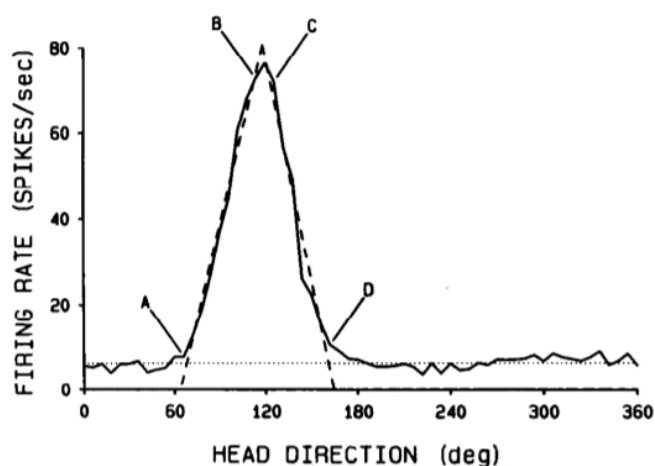
Obrázek 10 - **Odpověď buněk z oblasti CA1 v hipokampu na prostorovou orientaci potkana.** Šípky a písmena označují polohu zvířete, na spodním obrázku lze pozorovat tzv. firing rate jednotek v závislosti na poloze (O'Keefe a Dostrovsky 1971)

Problémy s orientací v prostoru a prostorovou pamětí obecně jsou běžně spojovány s hipokampálním poškozením u lidí. K převratnému objevu u zvířat (potkanů) došlo objevením místových buněk, tzv. place cells (obr. 10), které pálí, pokud se zvíře nachází ve specifické lokaci v prostoru (O'Keefe a Dostrovsky 1971). Buňky reagují různě na různá prostředí, jejich reprezentace a aktivita se liší. Jakmile však dojde ke vzniku reprezentace (tzv. place field), zůstává stabilní po dobu i několika týdnů, což naznačuje, že buňky kódují dlouhodobou paměť pro dané prostředí (Lever, a další 2002). Pokud dochází ke změně prostředí, dochází i ke změně aktivity jednotlivých buněk – tzv. remapping (Bostock, Muller a Kubie 1991).

Kromě odpovědi na přichozí informaci, buňky jsou také řízené proprioceptivními signály (vnímání svých vlastních pohybů v prostoru). K tomuto jim dopomáhají tzv. mřížkové buňky neboli grid cells (obr. 11). Ty se nachází v entorhinálním kortexu a pálí pravidelně v určitém intervalu v celém prostoru (čili ne, jako místové buňky, které pálí pouze v několika lokacích v prostoru) (Hafting, a další 2005). Dalšími buňkami, které napomáhají k reprezentaci prostoru jsou buňky směru hlavy (head-direction cells), které se nachází v oblasti postsubicula. Tyto buňky pálí pouze tehdy, pokud se hlava potkana nachází v určitém směru (obr. 12) (Taube, Muller a Ranck 1990).



**Obrázek 11 - Oblasti aktivity mřížkových buněk.** A-sagitální řez vrstvy II mediálním entorhinálním kortexem a místo nahrávání (červeně). B – Oblasti aktivity tří současně nahraných buněk během 30 min. Vlevo lze pozorovat trajektorii potkana (černě) a místa nejvyšší aktivity dané buňky (spikes – červeně). Uprostřed – mapa nejvyšších hodnot aktivity buněk. Vpravo – prostorová autokorelace (Hafting, a další 2005).

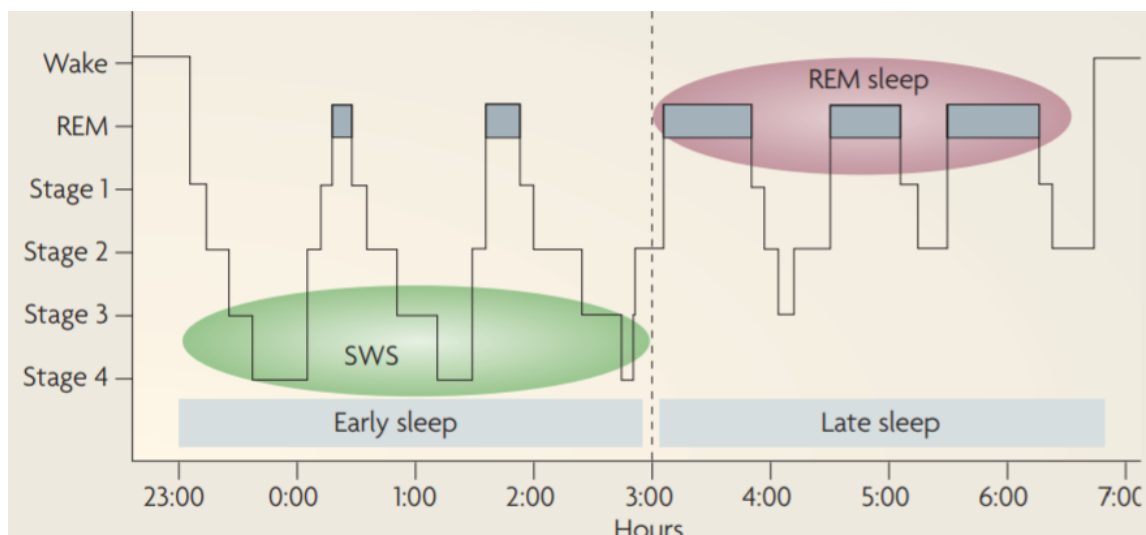


Obrázek 12 - *Příklad aktivity buňky směru hlavy* – pálí pouze v určitém směru, jindy zůstává neaktivní (Taube, Muller a Ranck 1990) .

## 2.2. Spánek a jeho vliv na paměť

Dříve byl fenomén spánku považován za nedůležitý, jeho fyziologie za nepodstatnou a jeho účel za pouze restorativní. Dnes už víme, že na spánek nelze pohlížet pouze jako na zranitelný maladaptivní stav, ale je třeba ho chápat jako stav, který zvyšuje účinnost určitého chování díky snížení energetických potřeb a správného načasování ve chvílích, kdy aktivní (bdělý) stav není přínosem pro organismus (Siegel 2009). Spánek je mimo jiné stav, který je nutný k optimalizaci konsolidace nově získaných informací, zatímco kódování a vyvolávání vzpomínek probíhají nejúčinněji v průběhu bdělého stavu. Jak už bylo zmíněno v kapitole o paměti, konsolidace je proces, který přeměňuje nově nabyté labilní paměťové stopy na jejich stabilnější verzi a ty se následně integrují do sítě dlouhodobé paměti.

Důležitým klíčem k porozumění vlivu spánku na paměť je pochopení různých fází, ve kterých se během spánku nacházíme (obr. 13). Prostřednictvím vzorů neuromodulační aktivity a elektrických potenciálů oscilací se zjistilo, že SWS (slow wave sleep) a REMS (rapid-eye movement sleep) podporují systémovou i synaptickou konsolidaci. Během SWS, při minimální cholinergní aktivitě dochází ke koordinované reaktivaci a redistribuci na hipokampu závislé paměti do neokortexu, zatímco REMS související se zvýšenou aktivitou tzv. plasticity-related immediate-early gene, při vysoké cholinergní a theta aktivitě napomáhá následné synaptické konsolidaci paměti v kortexu (Diekelmann a Born 2010).



Obrázek 13 - *Hypnogram – zastoupení SWS a REM v průběhu spánku u lidí* (Diekelmann a Born 2010).

Blahodárné účinky spánku (přesněji jeho SWS části) na deklarativní a procedurální paměť byly popsány několikrát. Množství pomalovlnné aktivity se dokonce zvyšuje po učení a koreluje s výsledky výkonu při testování. Homeostáze SWS odráží synaptické změny, které reflektují s aktuálními buněčnými potřebami (Huber, a další 2004). Jeden z prvních pokusů navíc dokázal rozlišit účinky spánku v první a ve druhé polovině noci, kdy převládají odlišné spánkové fáze. U lidí byly použity testy typu paired-associated list nebo mirror-tracing skills a bylo zjištěno, že záleží na fázi spánku a typu paměti. Zatímco výsledky testu deklarativní paměti (paired-associated list) se zlepšily v průběhu první poloviny spánku, kde převládá SWS, u procedurální paměti to bylo naopak a ke zlepšení došlo při spánku v pozdních hodinách, kdy převládá REMS (Plihal a Born 1997). Plasticita mozku během spánku nezahrnuje jednotný proces, různé typy paměti mají různé mechanismy konsolidace související se spánkem a jsou rozptýleny v různých částech mozku (Fogel, Smith a Cote 2007).

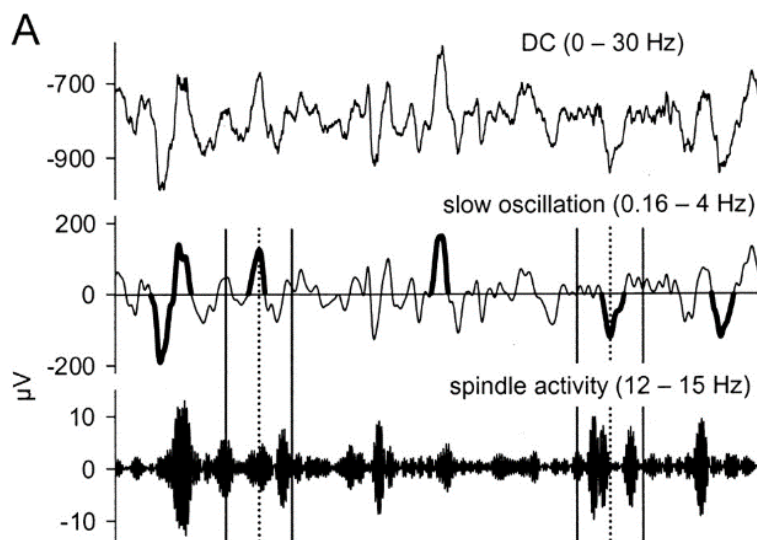
Ke zlepšení v deklarativní paměti stačí i poměrně krátký odpolední spánek, který je také bohatý na SWS, zatímco na procedurální paměť to nemá žádný vliv (Tucker, a další 2006).



### 2.2.1. Slow wave sleep

Pomalovlnný spánek (SWS) lze rozdělit na 4 fáze – 1. a 2. patří mezi lehký spánek, 3. a 4. fázi lze označit jako hluboký spánek. U lidí je nejvíc SWS zastoupeno v první polovině noci (obr. 13).

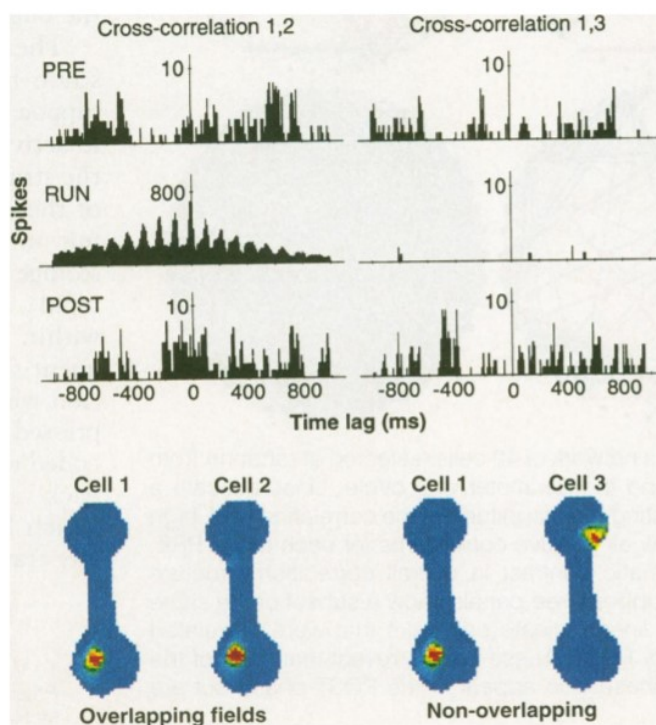
Během SWS jsou nejvíce zastoupeny pomalé oscilace (s frekvencí 0,2-4 Hz), která byla nejdříve nalezena u koček, pak i u lidí (< 1 Hz) (Achermann a Borbély 1997). Dále jsou během SWS zastoupena spánková vřeténka (sleep spindles; 7–14 Hz) nebo hipokampální oscilace (tzv. sharp wave ripples). Spánková vřeténka se seskupují během pozitivní části pomalých vln (obr. 14) (Molle, a další 2002). Je zřejmé, že jednotlivá vlnění se seskupují do kortikothalamických interakcí. Hlavním faktorem takové koalescence jsou právě pomalé vlny generované v kortexu, ty pak prostřednictvím kortikokortikálních a kortikothalamických drah regulují fáze dalších vln. Taková seskupení hrají velmi důležitou roli při synaptické plasticitě (Steriade 2006). Během pozitivní fáze pomalých vln v thalamokortikálních neuronech dochází k aktivaci T-typu  $\text{Ca}^{2+}$  napěťově řízených kanálů, které hrají důležitou roli ve spouštění synaptické a buněčné plasticity v kortikothalamické oblasti (Destexhe, a další 2007).



Obrázek 14 - **Analýza změn aktivity spánkových vřeten v závislosti na fázích pomalých oscilací.** DC – originální EEG, uprostřed je detekce pomalých vln a jejich pozitivních a negativních fází a dolní část znázorňuje detekci nejvyšší aktivity spánkových vřeten v závislosti na fázi pomalých vln (Molle, a další 2002).

Hipokampální přehrávání aktivity (replay) je nezbytné pro správnou konsolidaci paměti v hipokampálních neokortikálních sítích. Skupiny buněk, které se aktivovaly (pálily)

společně v průběhu učení, měly tendenci pálit spolu i během spánku (obr. 15) (Wilson a McNaughton 1994). Tento jev je přítomný v průběhu spánku i bdění, nicméně během spánku dochází ke znovuoaktivaci naučených reprezentací bez specifických senzorických vstupů (Karlsson a Frank 2009). Ke korelaci aktivity dochází tedy i mezi pomalými vlnami v neokortexu a hipokampálními oscilacemi, což poskytuje časový rámec pro posílení spojení a přenos informací mezi těmito strukturami (Sirota, a další 2003). Dochází ke konsolidaci na systémové úrovni. Korelaci aktivity mezi hipokampem a kortexem (přesněji mPFC) lze zaznamenat i delší dobu od učení a následném spánku, a to po dobu až 3–6 měsíců, kdy lze pozorovat postupné snížení hipokampální a zvýšení kortikální aktivity (Takashima, a další 2006). Paměťové stopy jsou redistribuovány z hipokampu do kortikálních oblastí z krátkodobého do dlouhodobého úložiště (Gais, a další 2007).



Obrázek 15 - **Cross-korelace aktivity buněk.** PRE – spánek před tréninkem, RUN - v průběhu tréninku, POST – spánek po tréninku. Lze pozorovat zvýšenou koaktivitu pro tu dvojici buněk (vlevo), která měla překrývající se prostorovou aktivitu, na rozdíl od buněk vpravo (Wilson a McNaughton 1994).

Podle synaptické hypotézy dochází také ke změnám amplitud a synchronicitě pomalých vln v závislosti na tom, zda se jedná o spánek na začátku či na konci noci (o tom bylo zmíněno v podkapitole o konsolidaci; viz obr. 2). Není však zcela jasné, jakým způsobem SWS vyvolává snížení síly synapsí. Nízké hladiny excitačních neurotransmiterů v průběhu

SWS a jeho depolarizační/hyperpolarizační stavy o frekvenci  $< 1$  Hz mohou specificky podporovat synaptickou depotenciaci (Kemp a Bashir 2001).

### 2.2.2. Rapid-eye movement sleep

REM fáze spánku by mohla být velmi důležitá pro synaptickou konsolidaci paměti. V průběhu ní jsou velmi charakteristické ponto-genikulo-okcipitální hroty (PGO; P-vlny) a theta vlny. Význam PGO hrotů byl zaznamenán u potkanů, kdy docházelo k výraznému zvýšení hustoty PGO hrotů během REM spánku v průběhu několika hodin po tréninku u pokusů typu active avoidance task. Zvýšení aktivity korelovalo se zlepšením výkonu při testu (Datta 2000). Paměťové procesy zahrnují excitaci buněk generujících P-vlny v oblasti mozkového kmene a zvýšenou fosforylaci CREB a syntézu Arc (activity-regulated cytoskeletal-associated protein) v dorzálním hipokampu, amygdale a frontálním kortexu. Učení také zvyšuje následnou syntézu BDNF (brain-derived nerve growth factor) v okcipitální kůře, amygdale a dorzálním hipokampu v různých časových intervalech (Ulloor a Datta 2005).

Theta oscilace (4-8 Hz) reprezentují „online“ stav hipokampu. Extracelulární proud generující theta vlny je z CA3 oblasti (Schafferovy kolaterály) a napěťově řízeným proudem  $\text{Ca}^{2+}$  pyramidových buněk dendritů. Tento rytmus je důležitý pro kódování aktivity neuronálních skupin a modifikaci synapsí. Je nejvíce zastoupen během REM spánku a v bdělosti při pravidelných lokomočních aktivitách (např. běh) (Buzsáki 2002). Existují důkazy hipokampálního přehrávání neuronální aktivity v průběhu REM spánku asociovaného s theta aktivitou. REM aktivita odráží neokortikální aktivaci hipokampálních okruhů v pozdních paměťových konsolidačních procesech (Louie a Wilson 2001).

Další důležitou vlastností v průběhu zpracování paměti je, že během REM spánku EEG aktivita (v různém frekvenčním zastoupení) vykazuje sníženou koherenci mezi limbickohipokampálními a thalamokortikálními obvody než během SWS. Během REM spánku odlišné paměťové systémy jsou rozpojeny kvůli předpokládanému zlepšení lokálních synaptických procesů (Robertson 2009). Tento jev by mohl také vysvětlit, proč REM spánek nenapomáhá konsolidaci deklarativní paměti, neboť tento proces se v zásadě

opírá o integraci informací do různých paměťových systémů. Je tedy nutné propojení mezi jednotlivými částmi mozku, což poskytuje SWS, nikoliv REMS.

### 2.3. Glukokortikoidy a stres

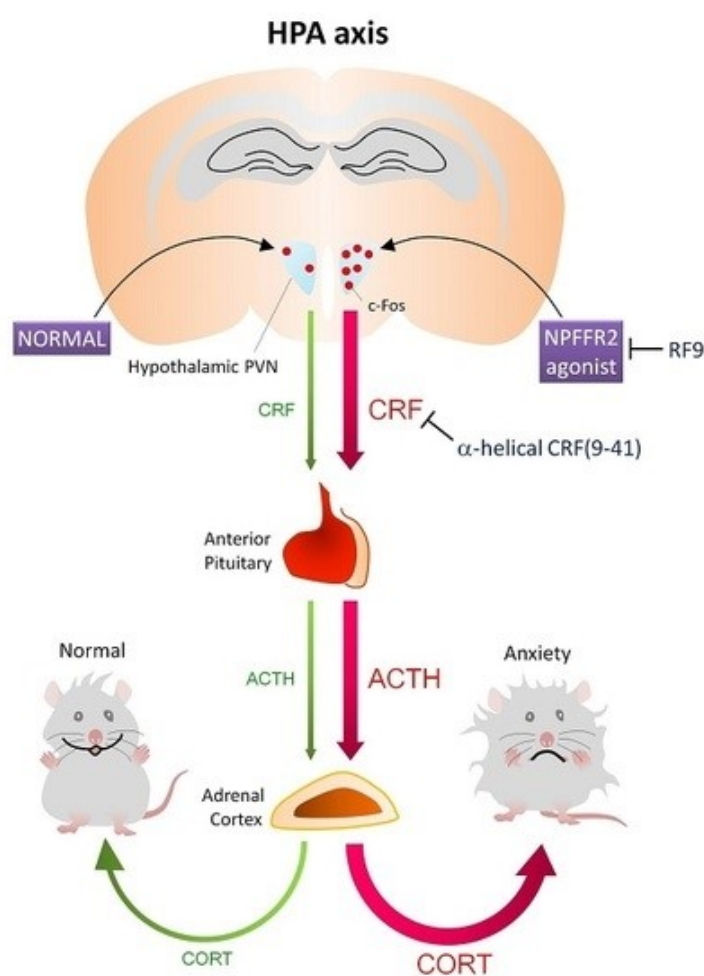
Narušení organismu (skutečné či předvídané), vyvolává stresovou reakci, která slouží k obnově homeostázy a k usnadnění adaptace. Podstatnou podmínkou stresové reakce jsou neurony v paraventriculárním jádře (PVN) hypotalamu, které exprimují kortikotropin uvolňující hormon (CRH) pomocí vazopresinu (VP) a dalších neuropeptidů, které řídí aktivitu sympatho-adreno-medulární a hypotalamus-hypofýza-nadledvinové (HPA) osy (obr. 16). Tyto dva systémy nejsou samostatnými entitami, ale vzájemně si regulují činnost, aby umožnily jedinci úspěšně se přizpůsobit měnícímu se prostředí. Ze dvou je systém HPA zahrnující kortikosteroidní hormon vylučovaný nadledvinami (kortizol u člověka nebo kortikosteron u potkanů) pomalejší a trvalejší ve svých činnostech (E. R. de Kloet, a další 1998). Vzhledem k povaze této diplomové práce se budeme dále zabývat primárně aktivitou HPA osy. Kromě účinné a úspěšné aktivace HPA osy a je také nutná její včasná a efektivní inhibice, jakmile stresor ustoupí (Lupien, a další 2009).

Stres a jeho účinky na nervový systém jsou zkoumány déle než 50 let. Glukokortikoidy jsou velmi důležité pro správný vývoj mozku, remodelování axonů a dendritů a mají vliv i na životnost nervových buněk v prenatálním období. Jakékoliv odchylky hladin glukokortikoidů od normy mohou vést ke změnám ve vývoji (Neyer 1983). Některé studie naznačují, že stres má mnoho účinků na nervový systém a může způsobovat i strukturální změny v různých částech mozku, jako jsou např. změny počtu glukokortikoidních a mineralokortikoidních receptorů v hipokampu (Weaver, a další 2004). Chronický stres pak může vést až k atrofii mozkové hmoty (Sarahian, a další 2014). Takové strukturální změny mohou vést k rozdílným odpovědím na stres, poznání a paměť (viz v následujících kapitolách).

#### 2.3.1. Osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny

Osa HPA (obr 16) představuje hlavní neuroendokrinní systém stresové reakce, který slouží k přizpůsobení organismu změnám, a tím udržuje stabilitu a zdraví (McEwen 2004).

Neurony lokalizované mediálně v parvocelulárním jádře (mpPVN) syntetizují a sekretují kortikotropin uvolňující hormon (CRH, CRF). Tento hormon (nebo faktor) se jeví jako hlavní regulátor aktivity HPA osy (Vale, a další 1981). Jako reakce na stres je CRF uvolňován přes portální cévu do adenohypofýzy, kde se váže na specializované receptory. Taková vazba vede k uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH) dále do systémového oběhu. ACTH je poté vychytáván v kůře nadledvin, kde stimuluje syntézu a sekreci glukokortikoidů v tzv. zona fasciculata (Stephens 2012). Glukokortikoidy následně regulují fyziologické změny spojené se vznikem stresové reakce přes své receptory (viz v podkapitole Receptory).



Obrázek 16 - Osa *hypothalamus-hypofýza-nadledviny* (Lin, a další 2017)

Bylo zjištěno, že CRF má vliv na četné faktory v aferentních drahách PVN. CRF1 a 2 receptory hrají velmi odlišnou roli – CRF1 je důležitý v akutní stresové fázi, naopak CRF2 je zapojen do fáze obnovení homeostáze (Reul a Holsboer 2002). Tyto aferentní dráhy

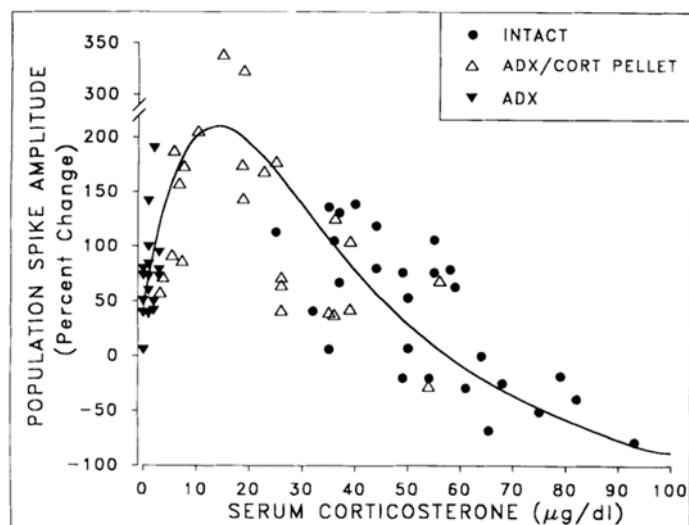
mohou buď posilovat, nebo zeslabovat odpověď HPA osy (Herman, a další 2003); zahrnují též signalizaci prozánětlivých a imunních odpovědí. Další místa, která jsou ovlivňována stresovými hormony, jsou místa zprostředkovávající kognitivní a emoční projevy stresové reakce – např. prefrontální kůra (Arnsten a Goldman-Rakic 1998), amygdala (Redgate a Fahringer 1973) a hipokampus (Rubin, Mandell a Crandall 1966). Celkové koncové účinky glukokortikoidů zahrnují mimo to např.:

- mobilizaci energie (glykogenolýzu) v játrech, a s tím spojenou stresovou hyperglykémii (Marik a Bellomo 2013);
- inhibici svalového růstu (Valenzuela, a další 2018);
- potlačení reprodukční funkce přes hypotalamo-hypofýza-gonadální osu (Kalantaridou, a další 2004), (Hardy, a další 2005);
- vliv na kardiovaskulární systém: zvýšení srdeční frekvence, síly kontrakce, vazodilatace v artériích kosterních svalů, zúžení žil, srážení arterií v slezině a ledvinách (Herd 1991), nebo naopak přes aktivaci parasympatického nervového systému snížení, až úplné zastavení srdečního rytmu (Pagani, a další 1991);
- vliv na gastrointestinální systém: ovlivnění chuti k jídlu přes NMDA receptory amygdaly (Sadeghi, a další 2015) nebo VTA oblasti (Nasihatkon, a další 2014), vliv na střevní propustnost, tvorbu žaludečních šťáv, funkci iontových kanálů a zánět GIT (Collins 2001);
- i na imunní systém (Glaser a Kiecolt-Glaser 2005).

Dlouhodobé působení takových katabolických procesů může organismus negativně ovlivňovat např. jako škodlivý faktor stárnutí (Landfield, Waymire a Lynch 1978) (Porter a Landfield 1998).

Osa HPA v organismu působí na dvou různých úrovních. Úroveň aktivity adrenokortikotropního systému je regulována endogenními (cirkadiánními) a exogenními (stresovými) stimuly. Sekrece glukokortikoidů během dne je pulzová, nejvyšší hladina hormonu se vyskytuje při zahájení bdělého cyklu u většiny obratlovců. Ovládání této rytmické aktivity je koordinované vstupy ze suprachiasmatického jádra (Keller-Wood a Dallman 1984). Vysoké koncentrace glukokortikoidů jsou zachycovány specifickými glukokortikoidními receptory (GR) (E. R. de Kloet, a další 1998). Například částečné obsazení hipokampálních glukokortikoidních receptorů je zapotřebí k účinnému učení v paměťových úlohách u potkanů. Je zřejmé, že množství kortikosteronu koreluje s velikostí

hipokampální plasticity. Grafické znázornění vztahu mezi množstvím kortikosteronu a velikosti hipokampální plasticity má tvar převráceného U (obr. 17), čili k účinku dochází nejlépe ve středních hodnotách množství kortikosteronu (Diamond, a další 1992).



Obrázek 17 - *Graf závislosti množství kortikosteronu a velikosti hipokampální plasticity* (Diamond, a další 1992)

Další úlohou v činnosti HPA je kontrola sekrece kortikosteroidů po stresu. Po přijetí "stresujícího" podnětu (lze takto označit nějaké předpovězené narušení homeostáze) dochází k iniciaci aktivního nárůstu hladin ACTH, což navíc vede k různým, již dříve zmíněným, fyziologickým změnám.

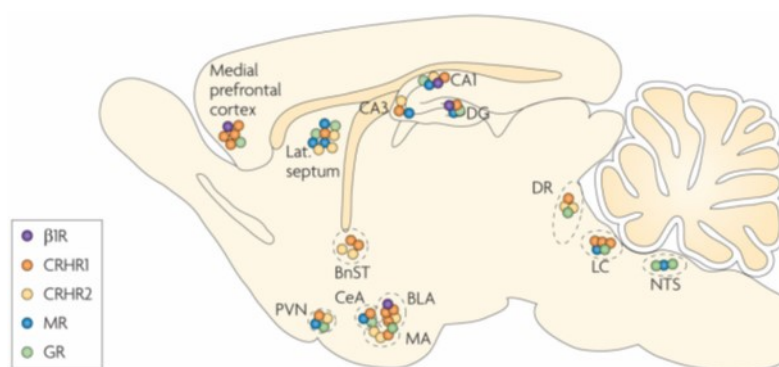
Glukokortikoidy zpětnovazebně regulují a inhibují HPA osu (prostřednictvím inhibice ACTH sekrece (Keller-Wood a Dallman 1984)), prodloužená hyperaktivita, nebo naopak hypoaktivita HPA osy může vést k překročení alostatické zátěží jednotlivce a k rozvoji onemocnění psychiatrického charakteru, jako je např. úzkost, deprese, či jiných patofyziologických stavů (hyperthyroidismus, hypofunkce reprodukčního systému, poruchy příjmu potravy, atd.) (Chrousos a Gold 1992). Stresová zátěž je hlavním rizikovým faktorem mnoha psychiatrických poruch – např. bipolární poruchy, schizofrenie, úzkostlivé poruchy, deprese, PTSD atd. (Hammen, a další 1992), (Walder, Walker a Lewine 2000), (Robinsin 1990).

### 2.3.2. Receptory

Expozice stresu aktivuje HPA osu a vede k uvolnění kortikosteroidů. Ty se v mozku váží na 2 typy receptorů: mineralokortikoidní (MR) a glukokortikoidní (GR). Jedná se o intracelulární receptory, které jsou součástí cytoplazmatického multiproteinového komplexu (Hutchison, Dittmar a Pratt 1994). Takový komplex se skládá z jedné molekuly receptoru a několika tzv. heat shock proteinů – např. Hsp90 (Mendel a Orti 1988) nebo Hsp70 (Beckmann, Mizzen a Welch 1990), dále pak p59, který se váže na receptor v neaktivní fázi (Sanchez, a další 1990).

Vazba ligandu vede k rychlému řetězci událostí, které se skládají z disociace chaperonů, což umožňuje aktivovaným receptorům translokaci do jádra, dimerizaci a následnou vazbu na určité senzibilní promotorové oblasti genů. Aktivace takové signální dráhy zahrnuje kaskádu buněčných, imunologických a fyzikálních změn prostřednictvím genomové transkripční regulace (Lu, a další 2006).

MR i GR jsou kolokalizovány a pro regulaci aktivity HPA osy se doplňují navzájem (synergismus či antagonismus v závislosti na buněčném kontextu). MR má vysokou afinitu ke kortikosteroidům, tyto receptory jsou obsazeny i při velmi nízkých koncentracích. GR má až 10krát nižší afinitu, proto se tyto receptory obsazují až ve chvíli, kdy je koncentrace kortikosteroidů velmi vysoká – např. při stresové reakci. Navíc jednotlivé receptory jsou zastoupeny různě v různých tkáních, a hlavně i v jednotlivých částech mozku (viz obr. 18).



Obrázek 18 - **Odlíšné zastoupení receptorů pro kortikosteroidy a jiné stresové mediátory** - β1R (β1-andrenergní receptor), CRHR1 (CRH receptor 1), CRHR2 (CRH receptor 2), MR (mineralokortikoidní receptor), GR (glukokortikoidní receptor). Nejvyšší zastoupení v mozku (tzv. „hot spots“) – prefrontální kůra, jádra amygdaly, hipokampus (oblasti CA1, CA3 a gyrus dentatus –DG), paraventriculární jádro hypotalamu (PVN), nucleus raphe (DR), locus coeruleus (LC).

Vysoká exprese GR mRNA se ukazuje v oblastech PVN a hipokampu (ale stále je to 3-5krát méně než MR v této oblasti (Patel, a další 2000)) (Senft, Meddle a Baugh 2016). Vysoká



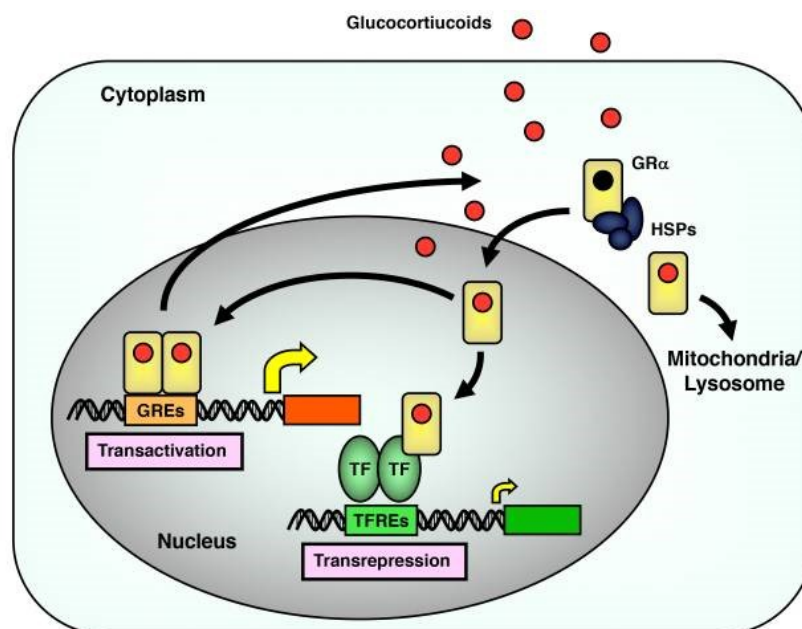
koncentrace GR se objevuje také v oblasti laterálního septa, dále pak v oblastech jako jsou nucleus tractus solitarius nebo amygdala. Nezanedbatelné množství GR je také v locus coeruleus, naopak velmi nízké množství je v subiculu (Reul a de Kloet 1985). MR se nachází nejvíce v oblasti hipokampální formace (Patel, a další 2000).

#### 2.3.2.1. Glukokortikoidní receptory (GR)

GR (genové jméno NR3C1 – podskupina jaderných receptorů) je exprimován téměř ve všech lidských tkáních a orgánech, včetně neurálních kmenových (Androutsellis-Theotokis, a další 2013). Působí pomalou genomickou dráhou a ovlivňuje normalizaci stresové odpovědi prostřednictvím řízení exprese genových rodin, jako jsou např. v imunitním systému TNF (tumor necrosis factor), SR (Scavenger receptor), TLR (Toll-like receptor), MHC (major histocompatibility complex) a mnoho dalších (Galon, a další 2002).

V nepřítomnosti ligandu se nachází primárně v cytoplasmě jako součást multiproteinového komplexu (hsp90) stejně jako MR (Denis, Gustafsson a Wikstrom 1988). Po vazbě ligandu se receptor disociuje z hsp a translokuje do jádra. Tam se váže na GRE (glucocorticoid response element) v promotorých oblastech cílových proteinů. Tato interakce je dynamická (McNally, a další 2000). Neaktivní forma citlivá na přítomnost ligandu a navázaná do komplexu s hsp se nachází v dynamické rovnováze mezi jádrem a cytoplazmou, kde může probíhat nepřetržitý přesun (shuttle) přes nukleární membránu tam a zpět. Bylo tedy zjištěno, že se proteinové komplexy s neaktivním GR mohou pohybovat skrz jaderní membránu stejně tak jako jejich aktivní volná forma (Haché, a další 1999). GR také moduluje aktivitu jiných transkripčních faktorů fyzickou interakcí s nimi. Po modulaci transkripce a snížení koncentrace hormonu se GR disociuje z ligandu a pomalu se vrací do cytoplazmy jako součást heterokomplexů s hsp. Existuje speciální nukleární kompartment s nízkou afinitou, kam se uvolňované GRs shromažďují a odtud se buď vrací zpátky do cytoplazmy, nebo může docházet rovnou k reasociaci s chromatinem při opětovném zvýšení hladin hormonu (Yang, Liu a DeFranco 1997). Ubiquitin-proteasomální dráha degraduje ligandem vázaný GR v jádře (Wallace a Cidlowski 2001). Pro přenos GR zpět do cytoplazmy bylo navrženo několik mechanismů:  $\text{Ca}^{2+}$  vazební protein kalretikulin přímo interaguje s DNA-vazebnou doménou jaderných receptorů, čímž dochází k přerušení interakce DNA a receptoru. Dalším krokem dochází k transportu komplexu receptoru-

kalretikulinu-RanGTP zpět do cytoplazmy (Holaska, a další 2001). Koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a RanGTP reguluje jaderný export zprostředkovaný kalretikulinem (Holaska, Black a Rastinejad, a další 2002). (obr. 19).



Obrázek 19 – **Intracelulární cirkulace GR.** GREs (glucocorticoid responsive elements); TFREs (transcription factor responsive elements); HSPs (heat shock proteins); TF (transcription factor) (Kino, a další 2003).

GR mají dvě hlavní regulační funkce na transkripci genů, a to buď transaktivaci nebo transrepresi. První funkce je zprostředkována zejména vazbou GR na DNA v promotorové oblasti specifických genů reagujících na glukokortikoidy. Mechanismy transreprese jsou složitější a jsou zprostředkovány potlačením aktivit jiných transkripčních faktorů prostřednictvím GR. Protizánětlivé účinky glukokortikoidů jsou způsobeny snížením exprese protizánětlivých genů (např. AP-1 a NF- $\kappa$ B) (Newton a Holden 2007).

#### 2.3.2.2. Mineralokortikoidní receptor (MR)

Zatímco úloha GR ve stresové reakci byla rozsáhle studována, důležitost MR v mozku při zpracování stresující informace není zanedbatelná. MR je důležitým modulátorem stresu a má vliv na bazální i stresem indukovanou aktivitu HPA osy.

MR se na rozdíl od GR soustřeďují hlavně v limbických oblastech – laterální septum, amygdala a hipokampus, zde je nejvyšší koncentrace receptorů dosažena v dorzálním subikulu (dSub), oblasti CA1 a gyrus dentatus (Reul a de Kloet 1985).

MR má ve srovnání s GR až 6-10ti násobně vyšší afinitu ke kortikosteroidům. MR je obsazena (> 90 %) za jakýchkoli podmínek endogenním hormonem po podání rozdílných dávek kortikosteronu, zatímco vyšší obsazenost GR (67-74 %) je pozorována pouze po stresu a během nejvyšší cirkadiánní koncentrace současně se zvýšením koncentrace kortikosteronu v plazmě (Reul a de Kloet 1985). MR má rychlý vliv na neurotransmisi a synaptickou plasticitu v hipokampu a amygdale za stresových okolností, mění rychle a reverzibilně signalizaci v hipokampu. Stresové hladiny hormonu zvyšují frekvenci miniaturních excitačních postsynaptických potenciálů v pyramidových neuronech CA1, redukují facilitaci párování pulzů a také vedou k hormonálně závislému zvýšení pravděpodobnosti uvolňování glutamátu (stimulací mobility AMPA receptorů na postsynaptické membráně). (Groc, Choquet a Chaouloff 2008).

Rychlý účinek kortikosteronu je způsoben prostřednictvím nongenomické dráhy zahrnující receptory umístěné na membráně. Neočekávaně tento rychlý efekt kriticky závisí právě na MR, jak dokazuje účinnost agonistů, antagonistů a inaktivace receptoru. MR je vázán v membráně a jeho rychlé působení prostřednictvím spojení se signálními molekulami ERK1/2 umožňuje buňkám měnit svou funkci během několika minut po navýšení hladin kortikosteroidů indukované stresem, kromě toho, že navíc reagují později prostřednictvím genových signálních cest přes jaderné receptory (Karst, Berger a Turiault, a další 2005). K rychlému zvýšení glutamatergního přenosu nongenomickou cestou dochází i u bazolaterálních amygdálních neuronů. Na rozdíl od hipokampu je tato změna dlouhodobá a umožňuje kódování emočních aspektů v průběhu stresových událostí. Taková dlouhodobá změna amygdálních neuronů ovlivňuje také následnou odezvu na další dávky kortikosteroidů, což následně může vést i k potlačení glutamatergního přenosu. V závislosti na průběhu stresové události může tedy odpověď bazolaterálních amygdálních neuronů měnit z excitační na inhibiční (Karst, Berger a Erdmann, a další 2010).

### 2.3.3. Vliv kortikosteroidů na některé mozkové oblasti

Neurony mpPVN představují konečný úsek dráhy, která se podílí na aktivaci HPA osy. Tyto buňky syntetizují a sekretují CRH, arginin vazopresin (AVP) aj., takové látky jsou zodpovědné za tzv. ACTH-zprostředkované uvolňování glukokortikoidů z kůry nadledvin. Hladiny glukokortikoidů jsou značně regulované inhibičními účinky působícími na různých úrovních, včetně adenohypofýzy, PVN a jiných oblastí mozku (Keller-Wood a Dallman 1984).

Vzhledem k povaze diplomové práce se zaměříme pouze na 3 mozkové oblasti – PFC, amygdala a hipokampus. PFC i hipokampus inhibují působení HPA osy, zatímco amygdala ji naopak aktivuje. Elektrická stimulace amygdaly podporuje biosyntézu glukokortikoidů a jejich sekreci u potkanů (Redgate a Fahringer 1973), ale i jiných zvířat (např. opic (Mason 1959). Naopak, léze velkých částí amygdaly (oboustranné) u potkanů snižují sekreci glukokortikoidů po stresových podnětech a k vyvolání stresové odpovědi nedochází (Knigge a Hay 1963).

Hlavní funkci prefrontálního kortexu (PFC) je pracovní paměť, což lze označit jako schopnost přechodně uchovávat informace. Bylo zjištěno, že ve frontálním kortexu dochází k vazbě autoradiograficky značeného kortikosteronu (Meaney a Aitken 1985) a že vysoká koncentrace GR se nachází kromě hipokampu také i v oblasti PFC (Cintra, a další 1994). Působením stresových hormonů dochází k masivnějšímu uvolnění excitačních neurotransmiterů (glutamátu a aspartátu) v této oblasti, než v hipokampu a bazálních gangliích (Moghaddam 1993). Zvýšení hladin těchto aminokyselin způsobuje uvolnění dopaminu přes presynaptický receptor EAAR (excitatory amino acid receptor) lokalizovaný na dopaminergní terminále nebo na jiných neuronálních systémech, které mohou napomáhat uvolňování dopaminu. Léze centrálního jádra amygdaly způsobují rapidní pokles iniciace uvolňování dopaminu v PFC vyvolané stresem (Davis, Hitcock, a další 1994). mPFC je důležitým místem pro inhibici HPA osy (podobně jako hipokampus), neboť při lézích v tomto regionu dochází k signifikantnímu zvýšení hladin ACTH a kortikosteronu po stresové události. Inhibiční vliv mPFC se projevuje pouze při zvýšených koncentracích kortikosteroidů, což souvisí s nutnou aktivací GR v PFC (Diorio, Viau a Meaney 1993).

Nejvíce je zapojen do inhibičních regulací hipokampus. Tato domněnka je posílena zjištěním, že hipokampus obsahuje největší množství receptorů pro adrenokortikosteroidy

typu I (mineralokortikoidní, MR) i 2 (glukokortikoidní, GR) v mozku. MR se dominantně vyskytují v oblasti laterálního septa a hipokampu. V hipokampu se největší množství MR nachází v subiculu a CA1 (144 fmol/mg proteinu) a v oblasti gyrus dentatus (104 fmol/mg proteinu). GR se, jak již bylo dříve zmíněno, vyskytuje v různých oblastech mozku, mimo jiné se nejvíc vyskytuje např. v oblasti laterálního septa (195 fmol/mg proteinu) a gyrus dentatus hipokampu (133 fmol/mg proteinu) (Reul a de Kloet 1985).

Podstatná část neuronů z PVN přijímá aferentní synaptické vstupy z laterálního septa a dorzálního hipokampu. Lze se domnívat, že existuje hipokampálně-septální dráha, která projikuje do PVN a má vliv na neurony sekretující CRH. Při stimulaci hipokampu dochází k inhibici části PVN, tzv. median eminence, která má opačný excitační vliv na sekreci CRH (Saphier a Feldman 1987).

Elektrická stimulace hippocampu inhibuje aktivitu HPA osy u lidí, a tím dochází ke snížení hladiny glukokortikoidů v plazmě (Rubin, Mandell a Crandall 1966). Při pokusech z roku 1976 se zjistilo, že u volně se pohybujících neanestezovaných zvířat elektrická stimulace hipokampu vedla zprvu k facilitaci, po které po krátké prodlevě následovala inhibice bazální aktivity HPA osy. Hipokampus má navíc roli v cirkadiánní regulaci HPA aktivity (inhibuje maximální cirkadiánní vzestup kortikosteronu) (Casady a Taylor). V dalším pokusu potkani (samice) byli anestezováni uretanem. Použití uretanu vedlo k velmi vysokým bazálním hladinám kortikosteronu v plazmě. Při stimulaci oblastí CA3, gyrus dentatus a subikula se potvrdilo signifikantní snížení hladin kortikosteronu v plazmě, zatímco při stimulaci oblasti CA1 se to nepotvrdilo a došlo naopak ke zvýšení hladiny (Dunn a Orr 1984). Stimulace dorzálního hipokampu má dlouhotrvající inhibiční účinky na adrenokortikální sekreci hypofýzy (sekreci ACTH) u volně se pohybujících zvířat (Feldman a Weidenfield 2001).

Aby se dala přesněji určit úloha neuronálních vazeb mezi hypotalamem a hipokampem a místa vstupu aferentních hypotalamických buněk souvisejících s adrenokortikální aktivitou, studovaly se účinky úplných nebo částečných hypotalamických deaferentací. Zvířatům byly provedeny 3 typy deaferentací: úplná – kdy oblast mediobazálního hypotalamu (MBH) byla úplně izolována od zbytku mozku; přední (anteriorní) – kdy preoptická oblast a supraschizmatická jádra byla oddělena od MBH; zadní (posteriovní) – kdy byl vytvořen řez v posteriovní části mamilárního jádra. Zjistilo se, že anteriorní i

posteriorní deafferentace mají podobný blokující účinek na adrenokortikální odezvu způsobenou elektrickou stimulací hipokampu (Feldman a Conforti 1981). Hlavní hipokampální eferentní dráhy fornixového systému jsou dráhy dorzálního fornixu a fimbria hippocampi. Jedná část je tvořena vlákny ze subikulárního kortexu dorzální hipokampální formace, které projikují prostřednictvím postkomisurálního fornixu do mamilárních jader a mediálního septa (Meibach a Siegel 1977). Anteriorní hypotalamická deafferentace úplně inhibuje adrenokortikální odezvu. Z toho vyplývá, že hipokampální signál, který aktivuje tuto odezvu, musí do hypotalamu vstupovat anteriorně. Avšak posteriorní deafferentace má podobný inhibiční účinek, kaudální šíření a posteriorní vstupy do hypotalamu jsou nezbytné pro adrenokortikální aktivaci hipokampu (Feldman a Conforti 1981).

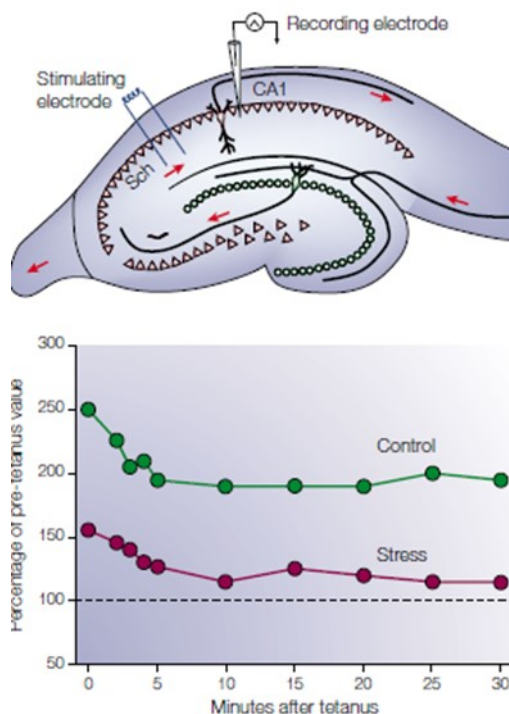
Hipokampální eferentní dráhy do oblasti PVN pochází primárně z oblasti ventrálního subicula (vSub) (Silverman, Hoffman a EA 1981). Axony neuronů z vSub končí v oblastech stria terminalis (BST), preoptické oblasti a mediobasálního hypotalamu. Tyto oblasti dále projikují do PVN (Sawchenko a Swanson 1983). Léze vSub vede ke zvýšení bazálních hladin glukokortikoidů i k hypersekreci po stresu (Herman, Dolgas a Carlson 1998). Stejně tak i léze hipokampu či ablace fornixu vedou k bazální hypersekreci glukokortikoidů (Knigge 1961). Některé studie tvrdí opak, léze fornixu (hipokampálních eferentních drah) nevede k inhibici osy HPA (Bradbury, Strack a F. 1993). Nesrovnalosti mezi experimenty mohou souviset s časovým rozložením experimentů v průběhu dne, nebo s designem experimentu. Navíc hipokampální léze způsobují zvýšenou bazální expresi CRH mRNA. Změny v sekrečních vzorcích mohou být způsobeny ztrátou signální funkce MR, o němž se předpokládá, že hraje velmi důležitou roli při zpětnovazební kontrole ACTH sekrece (Dallman, a další 1989). Nehledě na to, studie naznačují, že limbické struktury předního mozku (jako je právě vSub) jsou kritické pro správnou integraci kognitivních stresorů, ale zároveň nejsou nezbytné pro vypracování mnohých stresových odpovědí (Herman, Dolgas a Carlson 1998).

Hipokampus je cílové místo pro mnoho stresových hormonů. Reaguje také i na hormony gonád, štítné žlázy a samozřejmě i nadledvin. Tyto hormony modulují synaptickou a dendritickou plasticitu a regulují objem oblasti gyrus dentatus v průběhu vývoje i v dospělosti (McEwen 1999). O vlivu stresu na hipokampální plasticitu se zmíníme v následující kapitole.

### 2.3.3.1. Stres a hipokampální plasticita

Stres a zvýšené hladiny kortikosteroidních hormonů zhoršují kvalitu ukládání prostorové paměti. Dle studie z roku 1997 dlouhodobý stres má vliv na plasticitu  $\gamma$ -izoformy proteinkinázy C (PKC $\gamma$ -ir), která je důležitá pro správnou konsolidaci prostorové paměti. Za normálních podmínek se aktivita PKC $\gamma$ -ir v zadních (posteriočních) hipokampálních vrstvách CA1 a CA3 pyramidových buněk zvyšuje působením tréninku, zatímco při stresu se její aktivita specificky zvyšuje v oblasti DG a v předních (anteriorních) vrstvách CA3. Výsledky studie potvrzují dřívější nálezy (Luine, a další 1994), že dlouhodobý stres snižuje učící schopnosti, ovlivňuje referenční, pracovní paměť a způsobuje mezery v prostorovém učení (Krugers, a další 1997). Navíc, i když je už paměť konsolidována, stále jsou tyto paměťové stopy citlivé k působení vysokých hladin glukokortikoidů. Stres tedy navíc brání získání již nabytých informací a tyto účinky glukokortikoidů jsou zprostředkované aktivací GR v hipokampu (de Quervain, Roozendaal a McGaugh 1998).

Synaptický potenciál se zdá být podkladem pro učení a konsolidaci paměti v hipokampu a bývá velmi často narušován v souvislosti s aplikovaným stresem a vysokými hladinami kortikosteronu (obr. 20) (Foy, a další 1987).



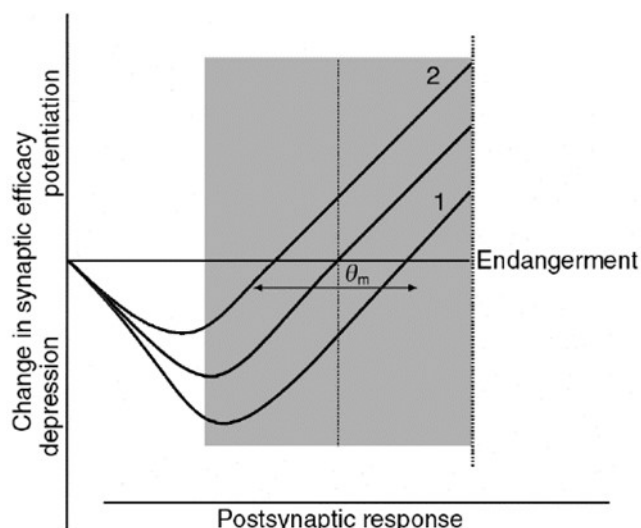
Obrázek 20 - *Snížení LTP v oblasti hipokampu v souvislosti se stresem in vitro* – Na horním obrázku je schematicky znázorněno rozpoložení elektrod na řezech. Na dolním grafu je znázorněna post-tetanická populace potenciálu nahraných z oblasti CA1 jako odpověď na stimulaci Schafferových kolaterál. Hipokampální řezy jsou z kontrolních a stresovaných zvířat (Foy, a další 1987).

Aktivace GR způsobuje potlačení dlouhodobé potenciace (LTP) v hipokampu, zatímco aktivace MR naopak působí pozitivně na LTP. Pokud byl potkanům injikován kortikosteron, metyrapon (inhibitor kortikosteron protein syntézy), nebo RU 28362 (agonista kortikosteronu), po usmrcení bylo na řezech z oblasti CA1 testována LTP. Zvířata s vysokými plazmatickými hladinami kortikosteronu (který se pravděpodobně vázal i na GR) nebo s dávkami RU 28362 vykazovala signifikantně nižší LTP než kontrolní zvířata (Pavlidis, a další 1996). To naznačuje, že stres nebo kortikosteron (nebo oboje) ovlivňuje následnou hipokampální plasticitu tím, že pravděpodobně sdílí stejné molekulární pochody potřebné k zajištění LTP.

Kromě toho bylo zjištěno, že kortikosteroidy mohou ovlivňovat i vlastnosti hipokampálních neuronů. Prodlužují hyperpolarizaci (afterhyperpolarization) zvýšením intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , a tím aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  dependentních  $\text{K}^+$  kanálů skrz modulaci napěťově závislé vodivosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Kerr, a další 1989). Tento účinek může být zprostředkován např. zvýšenou genovou expresí proteinů, které pozitivně ovlivňují vodivost membrány pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Taková exprese může být podporována aktivací GR. Ve studii z roku 1998 byl pozorován vliv chronické aktivaci MR a GR prostřednictvím zvýšených koncentrací kortikosteronu na expresní hladiny mRNA kódujících podjednotky NMDA receptorů v neuronech oblasti CA1. V těchto neuronech za normálních hladin kortikosteronu a aktivaci MR je nalezena signifikantně vyšší dominance NR2A podjednotky NMDA receptoru. Ovšem při chronicky vyšších hladinách kortikosteronu se začíná aktivovat i GR, a tím i zprostředkována genová exprese NR2B namísto NR2A. Složení NMDA receptorové podjednotky může být takovým způsobem modulováno pomocí hladin kortikosteronu (Nair, a další 1998).

Aktivita NMDA receptorů úzce souvisí s generací LTP (Obr. 21). Jejich předchozí aktivace může zvyšovat prahovou hodnotu pro LTP, a tím dochází k narušení indukce LTP (Coan, Irving a Collingridge 1989). Mechanismus odpovědný za tuto inhibici se může skrývat ve změně vlastnosti NMDA receptoru způsobené vysokými hladinami kortikosteronu (Huang, a další 1992). Nižší koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  odpovídající základním hladinám kortikosteroidů posunuje křivku prahu doleva, čili ve směru k potenciaci (LTP), zatímco vyšší hodnoty  $\text{Ca}^{2+}$  odpovídající vyšším hladinám kortikosteroidů ji posunují naopak doprava (směrem k LTD). Ke vzniku potenciace je tak potřeba dosažení mnohem vyššího prahu (Kerr, a další 1989).





Obrázek 21 - **Model stresu a jeho vliv na synaptickou plasticitu v hipokampu – Posunutí** prahu pro LTP vlivem zvýšených hladin kortikosteronu, a s tím souvisejícími změnami propustnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Stav 1 - graf se posouvá směrem doprava při vyšší koncentraci kortikosteroidů (a tím i vyšší propustnosti pro  $\text{Ca}^{2+}$ ), práh indukce pro LTP se zvyšuje a naopak dochází k indukci LTD. Stav 2 – graf se posouvá doleva a odpovídá standardním hodnotám kortikosteroidů (a tím i propustnosti pro  $\text{Ca}^{2+}$ ). Prah pro indukci LTP je nižší čili k LTP dochází ochotněji (Kim a Yoon 1998)

Stres posouvá křivku doprava, existují ale mechanismy, které regulují posunutí prahu pro indukci LTP zpět. Příkladem může být neurogeneze v hipokampu, která existuje i v dospělém mozku (Gould, a další 1999). Doplnění nových buněk, které zatím nemají žádné zkušenosti s vysokými hladinami kortikosteroidů, přispívá k posunu prahu do nižších hodnot. Další možný mechanismus souvisí s hormony, které regulují vodivost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů přes membránu. Estradiol se ukázal jako hormon, který propustnost  $\text{Ca}^{2+}$  v hipokampálních buňkách snižuje a stabilizuje tím vápníkovou homeostázi (Goodman, a další 1996). Zdá se také pravděpodobné, že calcium-kalmodulin kináza typu II (CaMKII), přesněji její  $\alpha$  isoforma, se také podílí na regulaci homeostázi vápníku v průběhu synaptické plasticity (Stevens, Tonegawa a Wang 1994).

Kromě vlivu na synaptickou plasticitu stres mění také morfologii dendritů a chronicky potlačuje neurogenezi granulárních buněk v oblasti gyrus dentatus (Gould, Tanapat, a další 1998). Skupina pod vedením McEwena ukázala, že dlouhodobé působení kortikosteronu vyvolá atrofii dendritů v oblasti hipokampu (Watanabe, Gould a McEwen 1992), celkové snížení délky a zmenšení hustoty rozvětvení dendritů. To všechno vede k celkovému snížení synapsí v hipokampální formaci (Sousa, a další 2000). Navíc podání antagonisty NMDA receptorů MK-801 způsobuje rapidní nárůst buněčné proliferace v oblasti DG

hipokampu. Z toho vyplývá, že nadměrná aktivace NMDA receptorů způsobuje pokles neurogeneze (Gould, McEwen, a další 1997).

### 3. Cíle diplomové práce

V této práci jsme se zabývali vlivem spánku na konsolidaci traumatické paměti u laboratorního potkana. Diplomová práce měla 3 hlavní cíle:

- zavést metody strachového podmiňování a metody nahrávání a vyhodnocování spánku u laboratorních zvířat do nové laboratoře v Národním ústavu duševního zdraví,
- popsat vliv spánku (spánkové deprivace) a vysoké intrahipokampální koncentrace kortikosteronu na konsolidaci na hipokampu závislé (kontextové) a hipokampu nezávislé paměti,
- zjistit změny chování po strachovém podmiňování způsobené spánkovou deprivací a intrahipokampální dávkou kortikosteronu.

Výsledky této práce mohou přinést nové aspekty problematiky posttraumatické stresové poruchy.

### 4. Materiál a metody

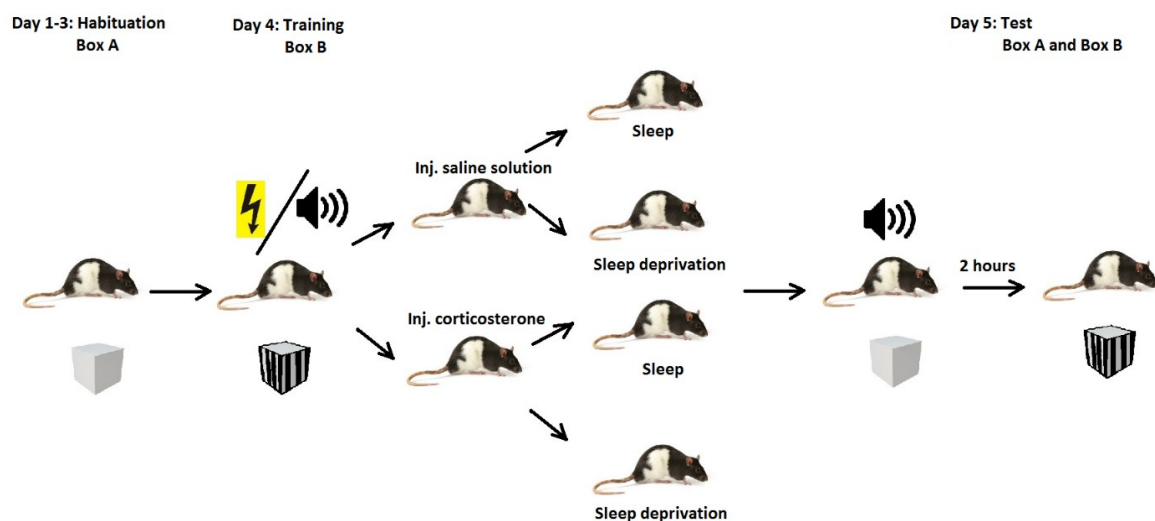
#### 4.1. Behaviorální pokus

##### 4.1.1. Experimentální zvířata

Experiment byl prováděn na potkanech kmene *Long Evans* (SPF; Velaz s.r.o., Konárovice, Česká republika). Jejich stáří bylo 3-5 měsíců a hmotnost se pohybovala v rozmezí 500-650 g v době pokusu. Potkani byli chováni po dvojicích ve standardních plastových chovných boxech v místnosti se sledovanou pokojovou teplotou (21°C) a pravidelným dvanáctihodinovým režimem světlo/tma. Přísun vody a jídla měli ad libitum. Všichni potkani byli experimentálně naivní a byli testováni pouze jednou. Po prodělané operaci byla zvířata rozdělena individuálně (z důvodu zachování implantovaných konektorů a kanyl).

#### 4.1.2. Design pokusu

Doba trvání experimentu pro jednotlivá zvířata byla 5 dní - 3 dny habituace, 1 den tréninku a 1 den testu. Jednotlivé části pokusu probíhali vždy ve stejnou denní dobu, v době mezi 10:00-16:00.



Obrázek 22 - Design experimentu a rozdělení zvířat do skupin

Podle designu experimentu (obr. 22) byla zvířata rozdělena na 4 skupiny podle toho, zda po tréninku spala (skupina SLEEP), či byla deprivována (skupina WAKE) a zda dostávala intrahipokampálně kortikosteron (skupina COR), nebo pouze fyziologický roztok (skupina F).

##### 4.1.2.1. Habituační

Pro samotný pokus byly připraveny 3 druhy boxů, ve dvou z nich byla zvířata trénována („bezpečný“ a „šokovací“ box), třetí sloužil jako box pro nahrávání spánku, či pro spánkovou deprivaci. Spánkový box byl umístěn do jiné místnosti, než ve které probíhal samotný experiment. Pro manipulaci se zvířaty byl použit neprůhledný válec.

První tři dny pokusu byla zvířata habituována na tzv. „bezpečný box“. Habituační trvala 4 min, ty každé zvíře trávilo volným prozkoumáváním boxu. Následně byla přemístěna na alespoň 2 hodiny do spánkového boxu, kde se zvykala na box samotný, místnost a přítomnost nahrávacího kabelu, který byl připojen na konektor na hlavě potkana. Během habituace byla také zvířatům zkontrolována kvalita EEG.

#### 4.1.2.2. *Trénink*

Trénink probíhal 4. den experimentu. Zvířata strávila 5 min a 30 s v tzv. „šokovacím“ boxu, který byl odlišný od boxu „bezpečného“. Během daného časového úseku zvířata obdržela v pseudonáhodném pořadí dvě elektrické rány mezi elektrodami umístěnými v mřížce podlahy boxu (tzv. footshock) a uslyšela také dva stejné tóny.

Ohned po skončení tréninku byl zvířatům intrahipokampálně injikován kortikosteron nebo fyziologický roztok. Následně byla přenesena do spánkového boxu, kde dle skupiny po dobu 2 hodin spala, či naopak byla udržována v bdělosti metodou „gentle handling“. Po skončení této doby byla zvířata přemístěna zpět do zvířetníku.

#### 4.1.2.3. *Testování*

Následující den po tréninku probíhalo testování chování zvířat v jednotlivých boxech. Testovalo se chování v „bezpečném“ boxu, zvířata měla 2 min na exploraci prostoru. Po 1 min v „bezpečném“ boxu byl zvířatům puštěn stejný ton, jako při tréninku. Po dvouhodinové pauze, kterou zvířata strávila ve své kleci, se testovalo chování v „šokovacím“ boxu, kde zvířata strávila také dobu 2 min tentokrát však bez tónu.

Po dokončení testu byla zvířata usmrcena (uvedená do narkózy etherem a následně dekapitována). Jejich mozky byly odebrány za účelem histologické kontroly správného rozpoložení kanyl v mozku.

Hodnoticím faktorem stresové odpovědi byl freezing a celková ušlá dráha u potkanů, a to po dobu prvních 60 s od začátku testování (prvotní reakce na prostředí). Freezing byl definován dle trajektorie potkana. Pokud se jeho poloha neměnila déle než 2 s, reakce byla zaznamenána jako freezing.

Hlavním faktorem, který se poměřoval mezi jednotlivými skupinami, byl procentuální rozdíl freezingu v „šokovacím“ a „bezpečném“ boxu. Větší rozdíl naznačoval lepší schopnost rozeznat nebezpečné prostředí od bezpečného. Naopak, pokud by nedokázali potkani boxy od sebe odlišit, rozdíl ve freezingu byl nižší. Stejným způsobem se vyhodnocovala ušlá vzdálenost v „šokovacím“ vs. „bezpečném“ boxu. Větší rozdíl v prošlé dráze indikoval větší schopnost jednotlivé kontexty od sebe odlišit.

#### 4.1.3. Metoda strachového podmiňování

Byla použita metoda kontextového strachového podmiňování, proto bylo potřeba připravit několik boxů, které by se od sebe co nejvíce lišily. Boxy jsme vyrobili v jedné velikosti 45 x 45 cm ze dvou materiálů – plexisklo a OSB deska. Kromě materiálu se boxy lišily také barvou a vzorem – box z plexiskla byl z vnější strany opatřen pruhou (střídání černé a zelené barvy), OSB box byl obarven na bílo a nalakován (aby nedošlo k usazení pachů). V průběhu experimentu byla také použita odlišná desinfekce pro každý box. Boxy používané jako „bezpečné“ nebo „šokovací“ byli střídáni. „Bezpečný“ box byl opatřen dnem a „šokovací“ box vodivou mřížkou, která byla napojena na šokovací zařízení.

Celkové parametry průběhu experimentu byly stanoveny na základě výsledků z předběžných testů, kde byl pozměněn jeden z parametrů:

- délka tréninku (11–5,5 min)
- celkový počet dvojic tón/šok (až 5 dvojic)
- síla a délka šoku (0,8mA - 0,4mA, délka 1–3 s)
- trvání pauzy mezi jednotlivými tóny a šoky (10–60 s)
- barva boxu (černý box byl vyřazen, neboť se zvířata zdržovala nejvíce v tmavých rozích a celkově se míň hýbala)

Optimální velikost a délka elektrické rány (tzv. footshock) byla 0,5 mA po dobu 1 s. Velikost a délka tónu byla: 15 s, 65 dB, 1 kHz. Zvířata celkově obdržela 2 šoky a 2 tóny a optimální doba tréninku byla 5,5 min. Pauza mezi tónem a šokem musela být alespoň 30 s, v případě kratší prodlevy měli potkani tendenci šok a tón spojovat. Zvířata na šoky reagovala adekvátně (freezing), při delším tréninku, nebo silnějších šocích, měla zvířata tendenci např. unikat z boxu, či se chovala celkově nepřírozeně (byla agresivní a neklidná, vůbec se nehýbala, nebo naopak byla aktivní). Takové chování by mohlo zkreslovat výsledné hodnocení behaviorálních pokusů.

Celkový průběh tréninku byl naprogramován v naší laboratoři pomocí Arduina, elektronické platformy od firmy Atmel následovně:

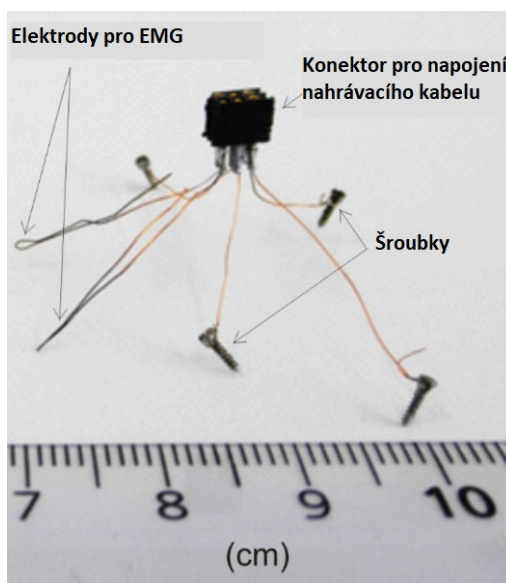
**60 s pauza – šok – 80 s pauza – tón – 30 s pauza – tón – 90 s pauza – šok – 30s pauza**

Průběh jednotlivých částí experimentu (habituační, trénink a test) byl vyhodnocován pomocí programu Ethovision XT 11,5 od společnosti Noldus, a poté ve vytvořeném programu v Matlabu (MathWorks, Natick, MA, USA).

## 4.2. Elektrofyziologie

### 4.2.1. Tvorba konektorů pro nahrávání EEG a EMG a intrahipokampálních kanyl

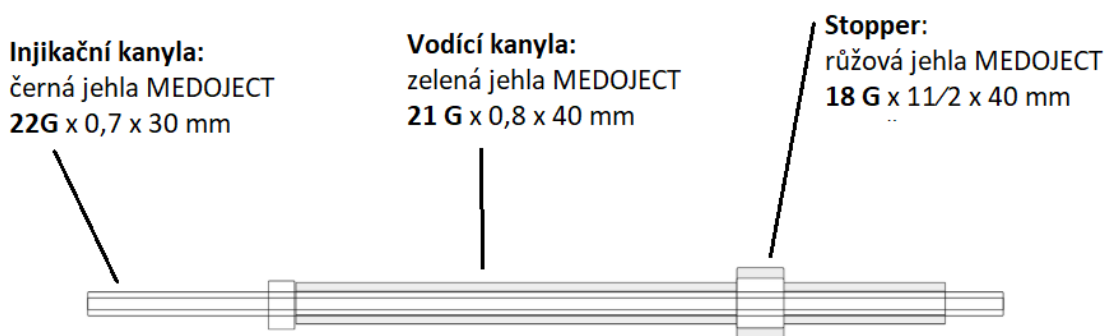
Před provedením samotné operace bylo potřeba připravit konektory pro nahrávání EEG a EMG (obr. 23). Na samotný konektor s 18 piny byly předem napojené izolované nikl-chromové drátky o tloušťce 0,003 mm (od společnosti California Fine Wire Company) s napájecími šroubkami (M1x2) a jedním volným odizolovaným koncem pro EMG nahrávání. Pro každého potkana bylo potřeba připravit nový konektor, aby se zamezilo ničení nikl-chromových elektrod.



Obrázek 23 - Příklad vzhledu konektoru pro nahrávání EEG a EMG

Pro farmakologickou část pokusu bylo potřeba připravit také intrahipokampální kanyly, které byly do mozku zavedeny chronicky. Kanyly byly vyrobeny z injekčních jehel tří velikostí značky MEDOJECT dle vzoru (obr. 24). Délka vodící kanyly byla 1,5 cm, stopper byl přitaven 2 mm od začátku vodící kanyly tak, aby se po zanoření do mozku opíral o lebeční kost a bránil tak hlubšímu ponoření vodící kanyly do otvoru. Vnitřek vodící kanyly byl

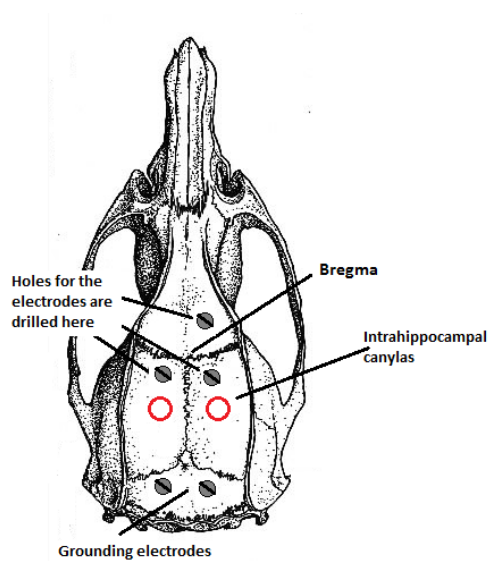
zaplněn stejně tlustým drátkem, aby došlo k zamezení infekce a aby nedošlo k ucpání kanyly (např. zaschlou krví).



Obrázek 24 - Vzor připravovaných intrahipokampálních kanyl z injikačních jehel Medoject

#### 4.2.2. Stereotaktická operace

Potkanům byly implantovány konektory pro nahrávání EEG a EMG a intrahipokampální kanyly. Potkani byli uvedeni do celkové anestézie inhalačním roztokem isofluranu a upevnění do stereotaktické konstrukce (Stoelting), kde byli udržováni v anestezii maskou protékající 2,5 % isofluranu po zbytek operace. Po obnažení a očištění lebky pomocí skalpelu bylo navrtáno 5 otvorů (dle obr. 25) tak, aby došlo k provrtání lebky, a zároveň se nepoškodil mozek. Do každého z otvorů byl umístěn šroubek. Tři z nich tvořily samotné elektrody pro EEG – ve frontální a parietální části lebky, další 2 tvořily zemnicí elektrody v okcipitální kosti. EMG elektroda byla zavedena pod kůži do šíjové oblasti. Následně byla zaměřena bregma a z jejich koordinát byly vyvrtány další 2 otvory pro umístění vedoucích kanyl nad hipokampem (3 mm posteriorně, 2,5 mm laterálně od bregmy). Kanyly byly zanořeny 2 mm pod úroveň mozku, aby končily těsně nad povrchem dorzálního hipokampu. Konektor i kanyly na lebce byly fixovány pomocí dentacrolu (zubařský cement). Dentacrol byl vylit na povrch suché a očištěné odhalené lebky tak, aby pokryl odhalené šroubky a piny konektoru a upevnil kanyly, aby nedošlo k jejich ztrátě při manipulaci se zvířetem. Rána okolo byla ošetřena dezinfekcí a následně namazána framykoinem, aby nedošlo k zanícení. Po probuzení byl zvířatům podán loxicom, případně jim byl rozpuštěn nurofen do pitné vody v koncentraci 2,5ml/500ml vody. Zvířata byla následně sledována po dobu cca 1 týdne do úplného zahojení rány kolem implantátu a teprve potom byla použita do pokusu.

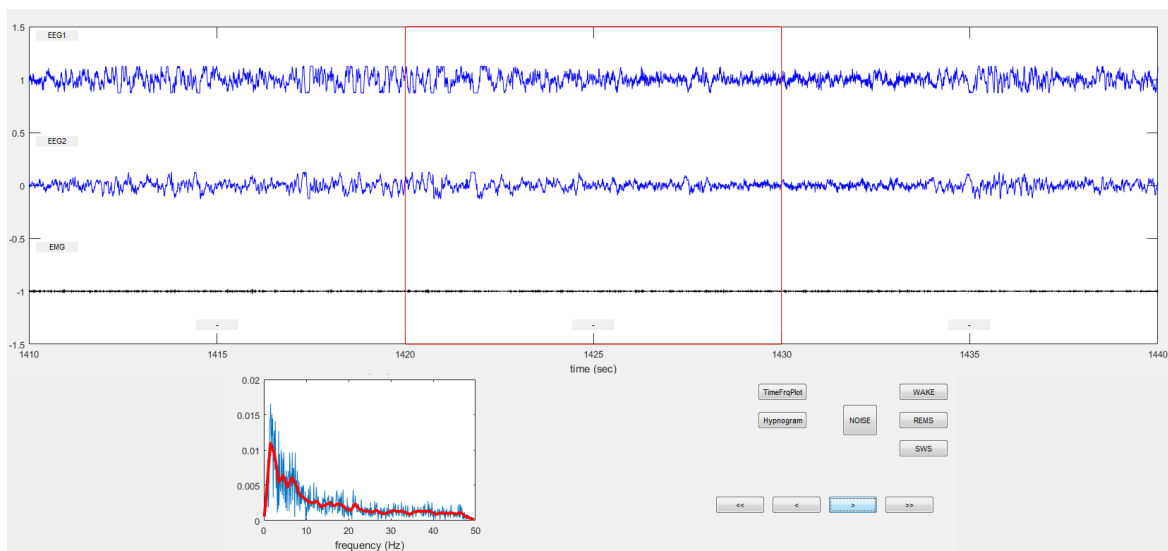


Obrázek 25 - *Schematické znázornění uspořádání kanyl a elektrod pro snímání EEG*

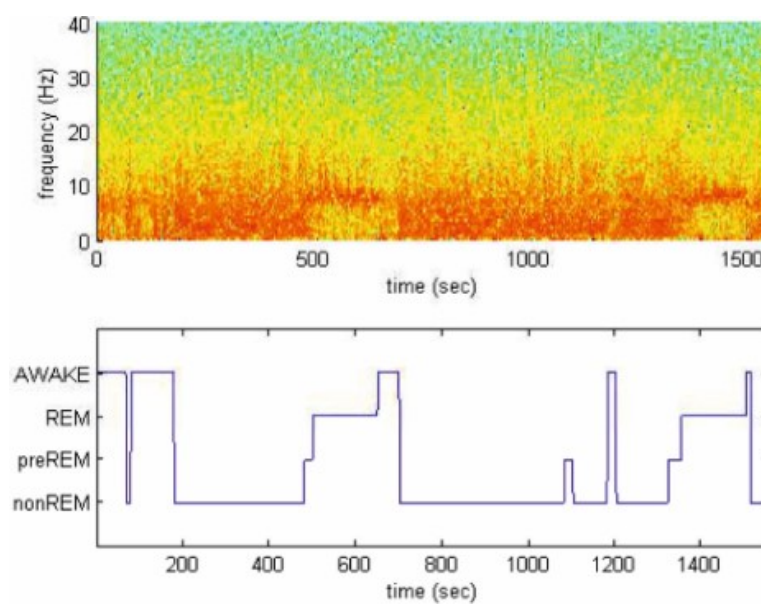
#### 4.2.3. EEG nahrávání a vyhodnocování

Během spánku jsme pomoci elektrofyziologického nahrávacího systému firmy Axona Ltd. (St. Albans, U. K.) nahrávali EEG a EMG, které jsme následně vyhodnocovali pomocí programu vytvořeného v naší laboratoři v Matlabu (MathWorks, Natick, MA, USA) (obr. 26). Nahrávky EEG a EMG byly skórovány manuálně. Nejdříve byl celkový čas rozdělen na 10sekundové úseky, které byly následně vyhodnoceny. Dle průměrné frekvence a vzoru EEG a EMG byly úseky rozděleny do jednotlivých fází – SWS (nonREM), REM nebo awake (bdění). Jednotlivé výsledky byly následně sečteny a byl spočítán celkový čas, který jednotlivá zvířata strávila v jednotlivých fázích (obr. 28). Pro každé zvíře byl také vytvořen hypnogram (obr. 27).

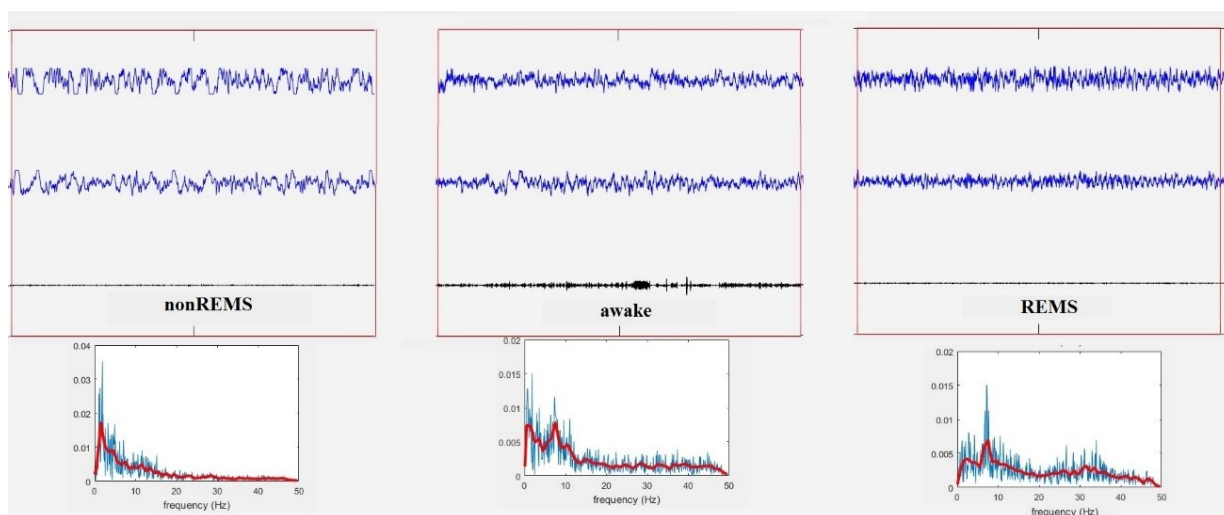




Obrázek 26 - Reprezentace EEG a EMG nahrávání v Matlabu



Obrázek 27 - Příklad výsledného vzhledu hypnogramu.



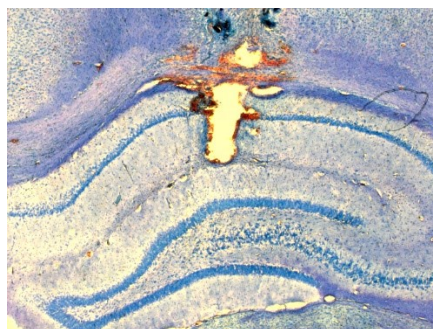
Obrázek 28 – *Reprezentace jednotlivých fází zastoupených v průběhu dvouhodinového nahrávání potkanů bezprostředně po tréninku*

### 4.3. Farmakologie

#### 4.3.1. Intrahipokampální injekce

Injikační kanyla (obr. 29) byla zavedena do vodící kanyly (dle obr. 24), která byla chronicky implantována v průběhu stereotaktické operace, tak, aby se zanořila do hloubky 3,4 mm do mozku. Injikovaný roztok se tak dostal do dorzálního hipokampu. Dle rozdělení do dvou skupin zvířata dostávala buď roztok kortikosteronu, nebo fyziologický roztok.

Používali jsme ABC komplex kortikosteronu od společnosti Sigma. Takový kortikosteron byl navázán na komplex, a proto byl rozpustný ve vodě. Celková koncentrace kortikosteronu byla 10 ng/1  $\mu$ l a do levého a pravého hipokampu byl pomalu injikován 1  $\mu$ l roztoku.



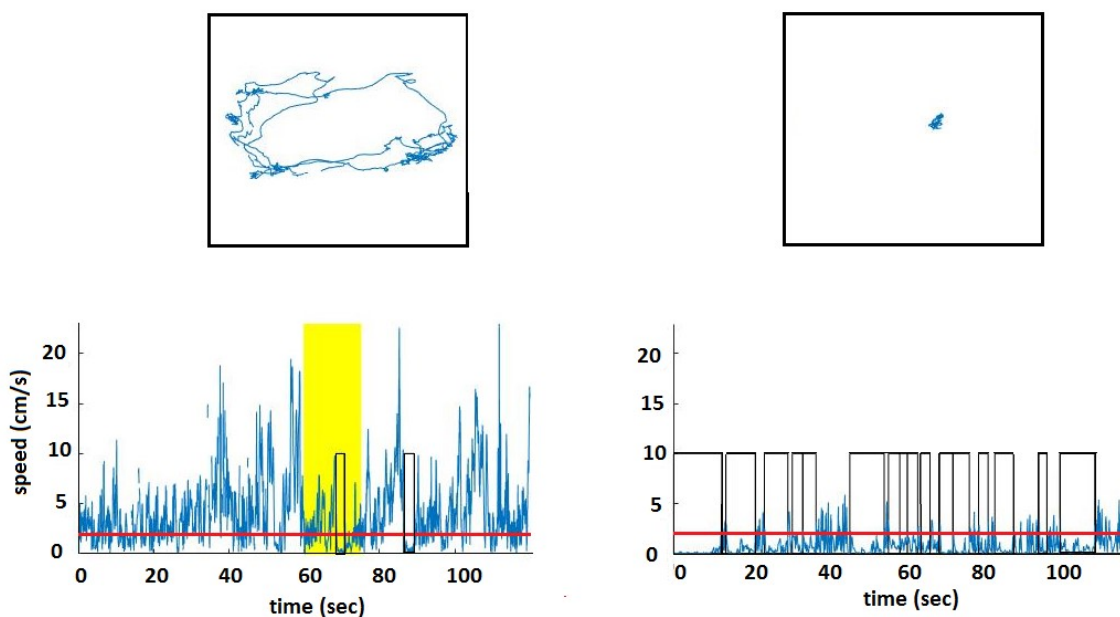
Obrázek 29 - *Rozložení injikační kanyly v hipokampu u potkanů.*

## 5. Výsledky

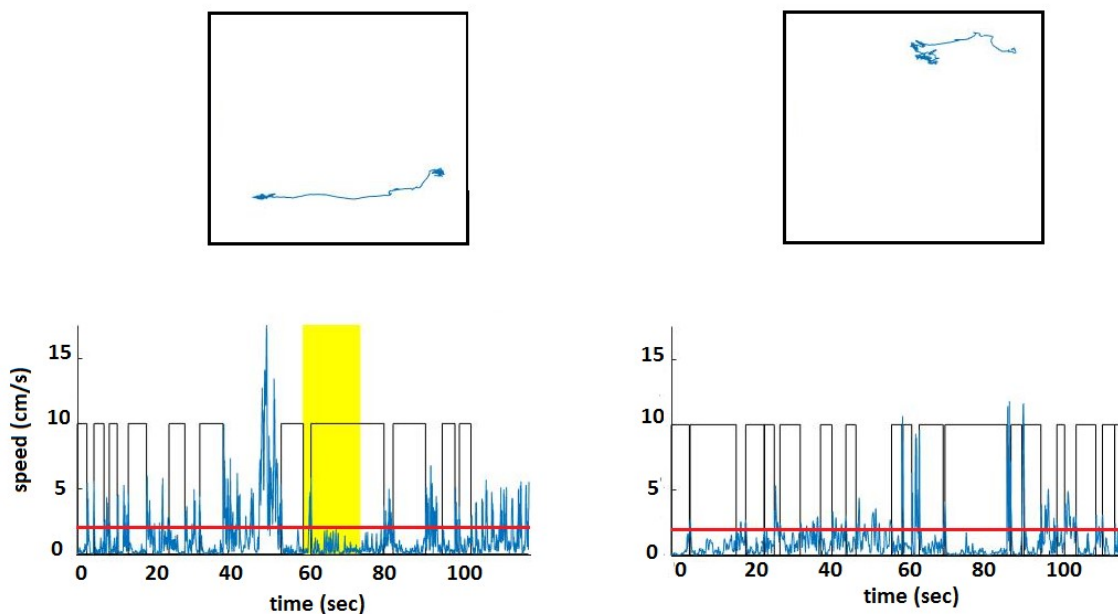
### 5.1. Spánek podporuje konsolidaci paměti pro kontext traumatické události

Během testování (Graf 1) potkani ze skupiny SLEEP/F v průběhu prvních 60 s v „bezpečném“ boxu freezovali  $9,29 \pm 2,51$  s ( $15 \pm 7$  %). V „šokovacím boxu“ se chovali signifikantně jinak. Z prvních 60 s zvířata freezovala  $32,89 \pm 5,73$  s ( $55 \pm 8$  %). Rozdíl v chování zvířat „šokovací“ vs. „bezpečný“ box byl  $39 \pm 12$  %. T-test ukázal, že rozdíl byl signifikantní ( $t_{(16)}=3,76$ ,  $p=0,002$ ). Ukázku chování potkana z této skupiny lze pozorovat na obr. 30.

Oproti tomu zvířata ze skupiny WAKE/F (ukázka chování obr. 31), která byla ihned po tréninku 2 hodiny spánkově deprivována, freezovala v obou prostředích. V „bezpečném“ boxu zvířata freezovala  $28,6 \pm 5,76$  s z 60 s ( $48 \pm 10$  %), v „šokovacím“ boxu  $23,82 \pm 5,72$  s z 60 s ( $40 \pm 10$  %). Rozdíl v chování zvířat deprivované skupiny „šokovací“ vs. „bezpečný“ box byl  $-8 \pm 11$  %, což dle T-testu není statisticky signifikantní ( $t_{(16)}=0,56$ ,  $p=0,59$ ).

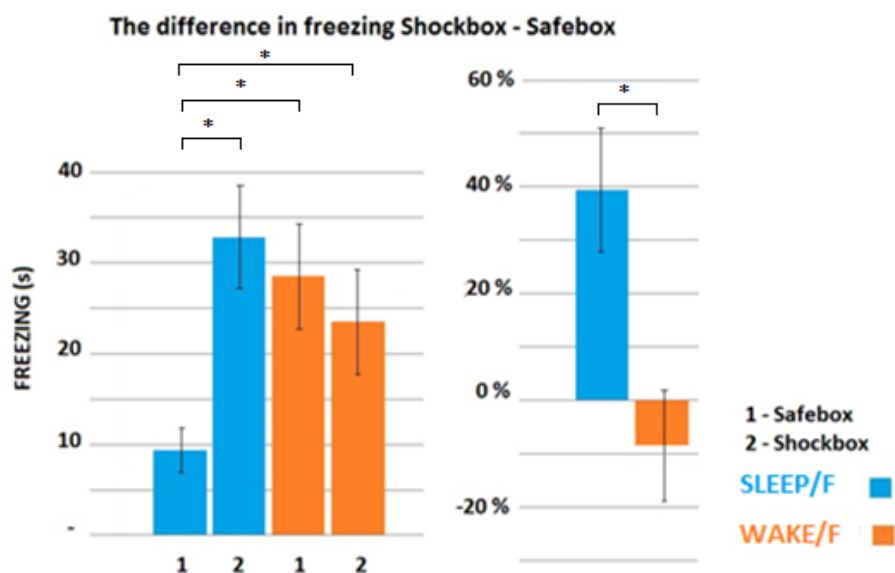


Obrázek 30 -*Reakce potkana ze skupiny SLEEP/F*. Horní obrázky znázorňují jeho pohyb v boxu. Dolní obrázky jsou grafy znázorňující rychlost jeho pohybu v závislosti na čase. Obrázky vlevo značí jeho reakci na „bezpečný“ box. Lze pozorovat kontinuální pohyb bez freezingu. Žlutě je značen čas, kdy potkan slyší tón. Obrázky vpravo značí reakci na „šokovací“ box. Prázdnými obdélníky je na grafu znázorněny úseky freezingu. Nahoře je patrné, že potkan prostředí neexploroval.



Obrázek 31 --**Reakce potkana ze skupiny WAKE/F.** Horní obrázky znázorňují jeho pohyb v boxu. Dolní obrázky jsou grafy znázorňující rychlost pohybu v závislosti na čase. Obrázky vlevo značí jeho reakci na „bezpečný“ box. Žlutě je značen čas, kdy potkan slyší tón. Obrázky vpravo značí reakci na „šokovací“ box. Prázdnými obdélníky je na grafu znázorněny úseky freezingu, které zde patrně převažují nad pohybem. Je také patrné, že ani jedno z prostředí potkan hojně neexploroval.

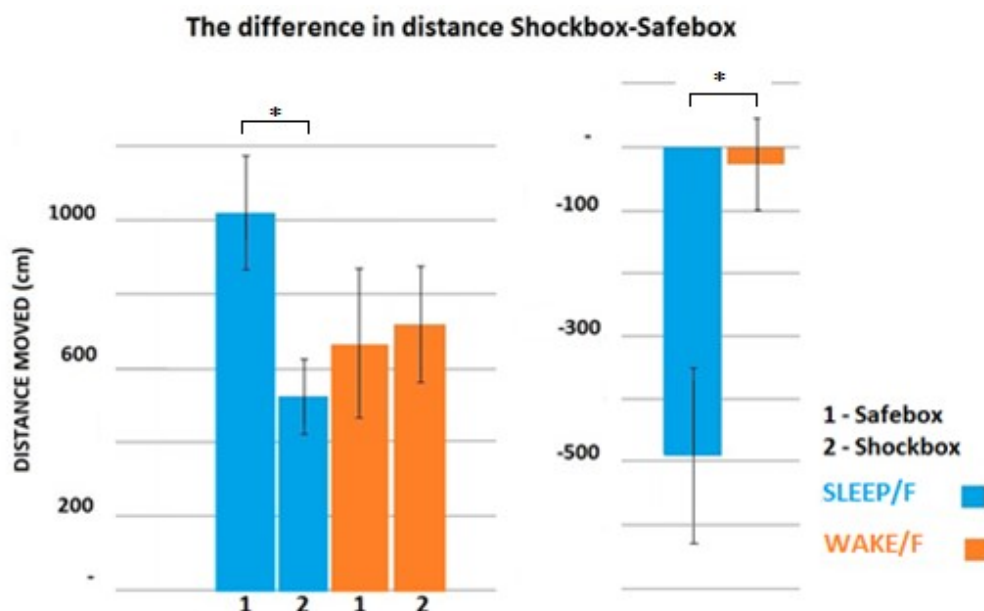
Rozdíl chování v bezpečném boxu u skupin SLEEP/F a WAKE/F byl dle T-testu signifikantní ( $t_{(16)} = -2,89$ ,  $p = 0,01$ ). Statistické porovnání procentuální hodnot rozdílu u skupin SLEEP/F a WAKE/F vykazuje signifikantní rozdíl ( $t_{(16)} = 2,89$ ,  $p = 0,01$ ).



Graf 1 – **Porovnání odpovědi jednotlivých skupin na jednotlivá prostředí.** Skupina SLEEP/F reaguje signifikantně na jednotlivá prostředí ( $t_{(16)}=3,76$ ,  $p=0,002$ ), zatímco skupina WAKE/F nikoliv ( $t_{(16)}=0,56$ ,  $p=0,59$ ). Procentuální hodnota freezingu v „šokovacím“ vs. „bezpečném“ boxu je dána rozdílem procentuálního zastoupení freezingu v prvních 60 s v prostředí. Čím je větší hodnota rozdílu, tím lépe dokáží skupiny odlišit jednotlivá prostředí od sebe. Daná hodnota u jednotlivých skupin SLEEP/F a WAKE/F se signifikantně liší ( $t_{(16)} = 2,89$ ,  $p = 0,01$ ).

Velmi podobných výsledků se dosáhlo při porovnání celkové ušlé dráhy (Graf 2). V „bezpečném“ boxu skupina SLEEP/F se pohybovala signifikantně více ( $1008,46 \pm 164,96$  cm) oproti „šokovacímu“ boxu ( $520,05 \pm 106,39$  cm). Rozdíl v pohybu v jednotlivých boxech činil  $-488,41 \pm 143,36$  cm ( $t_{(16)}=2,35$ ,  $p=0,03$ ). Spánkově deprivovaná skupina WAKE/F se v obou boxech chovala podobně ( $673,86 \pm 201,51$  cm v „bezpečném“ a  $651,79 \pm 165,04$  cm v „šokovacím“) s celkovým rozdílem  $-22,07 \pm 76,45$  cm ( $t_{(16)}=0,08$ ,  $p=0,94$ ).

Statistické porovnání hodnot rozdílu ušlé dráhy v „šokovacím“ a „bezpečném“ boxech u skupin SLEEP/F a WAKE/F vykazuje signifikantní rozdíl ( $t_{(16)} = -2,71$ ,  $p = 0,016$ ).

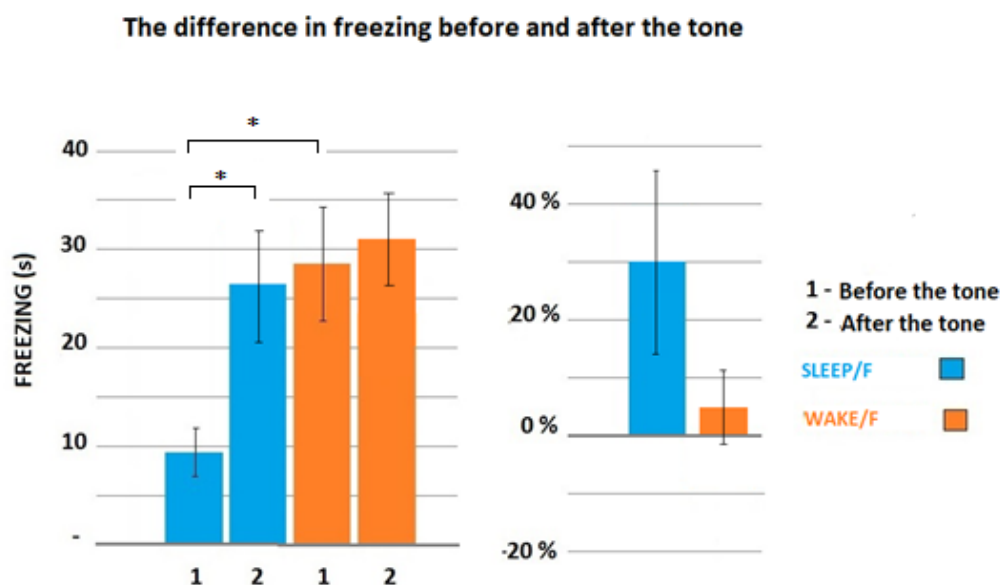


**Graf 2 - Rozdíl v ušlé vzdálenosti po dobu prvních 60 s v jednotlivých prostředích u obou skupin.** Na grafu vpravo je patrné, že skupina SLEEP/F se v „bezpečném“ boxu pohybovala mnohem více, než v boxu „šokovacím“ ( $t_{(16)}=2,35$ ,  $p=0,03$ ). Skupina WAKE/F se chovala podobně v obou boxech ( $t_{(16)}=0,08$ ,  $p=0,94$ ). Na grafu vpravo je patrný rozdíl v ušlé vzdálenosti v „šokovacím“ vs. „bezpečném“ boxu v prvních 60 s. Čím je nižší hodnota rozdílu, tím je rozdíl v chování signifikantnější.

Testovala se také reakce potkanů na tón (graf 3). U skupiny SLEEP/F, která před tónem freezovala v „bezpečném“ boxu  $9,29 \pm 2,51$  s ( $15 \pm 7$  %), se reakce objevila (po tónu se freezing zvýšil na  $27,3 \pm 6,85$  s ( $46 \pm 11$  %)). Dle T-testu je rozdíl signifikantní ( $t_{(16)}=-2,29$ ,  $p=0,036$ ). Naopak skupina WAKE/F freezovala před i po tónu (před  $28,6 \pm 5,76$  s z 60 s

( $48 \pm 10$  %), po tónu  $31,62 \pm 5,24$  s z 60 s ( $53 \pm 9$  %). Rozdíl nebyl signifikantní ( $t_{(16)} = -0,37$ ,  $p = 0,72$ ).

Statistické porovnání hodnot procentuálního rozdílu po vs. před tónem u skupin SLEEP/F a WAKE/F nebylo signifikantní ( $t_{(16)} = 1,86$ ,  $p = 0,082$ ).



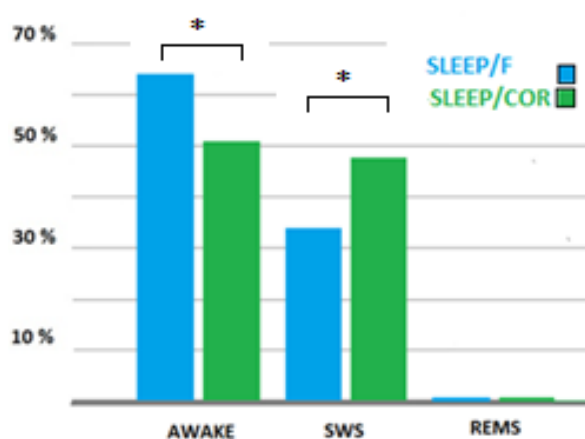
**Graf 3 - Porovnání odpovědi jednotlivých skupin na tón.** Skupina SLEEP/F reaguje signifikantně na spuštění tónu ( $t_{(16)} = -2,29$ ,  $p = 0,036$ ), zatímco skupina WAKE/F nikoliv ( $t_{(16)} = -0,37$ ,  $p = 0,72$ ). Procentuální hodnota freezingu v „bezpečném“ boxu po a před tónem je dána rozdílem procentuálního zastoupení freezingu za dobu 60 s po spuštění tónu. Čím je větší hodnota rozdílu, tím je větší odpověď skupin na tón.

## 5.2. Vysoká intrahipokampální koncentrace kortikosteronu zvyšuje množství SWS

Z celkových dvou hodin, zvířata ze skupiny SLEEP/F strávila  $34,8 \pm 2,38$  % ve fázi SWS a  $0,8 \pm 0,43$  % ve fázi REM spánku (Graf 4). Na rozdíl od nich skupina SLEEP/COR, která ihned po tréninku dostala intrahipokampální injekci kortikosteronu, strávila signifikantně více času ve fázi SWS ( $47,9 \pm 2,3$  %) dle T-testu ( $t_{(8)} = -2,97$ ,  $p = 0,018$ ). Rozdíl v délce REM fáze nebyl zaznamenán ( $0,8 \pm 0,6$  %).

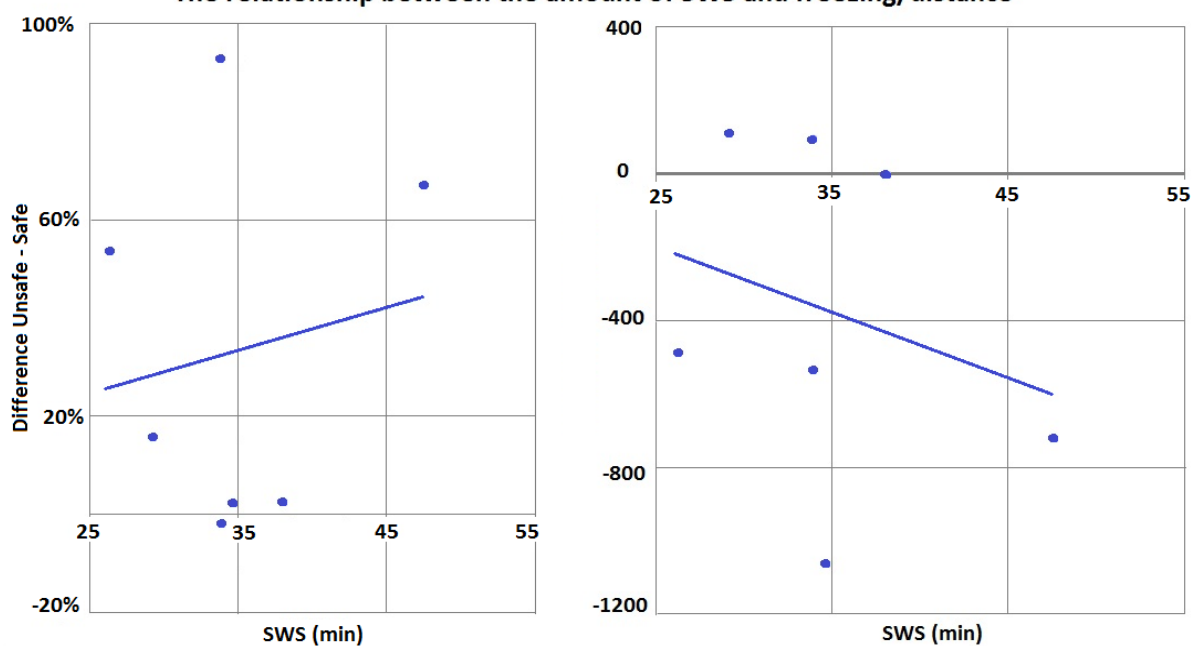
U zvířat ze skupiny SLEEP/F lze pozorovat trend korelace množství SWS na rozdíl freezingu v jednotlivých prostředích. Čím bylo vyšší zastoupení SWS fáze po dobu dvou hodin po tréninku, tím byla větší procentuální hodnota rozdílu freezingu nebo ušlé vzdálenosti (Graf 5).

The comparison of representation of sleep phases



Graf 4 - Zastoupení fází během spánku u zvířat. Mezi skupinami SLEEP/F a SLEEP/COR lze pozorovat signifikantní rozdíl v délce SWS fáze ( $t(8)=-2,97$ ,  $p=0,018$ ).

The relationship between the amount of SWS and freezing/distance



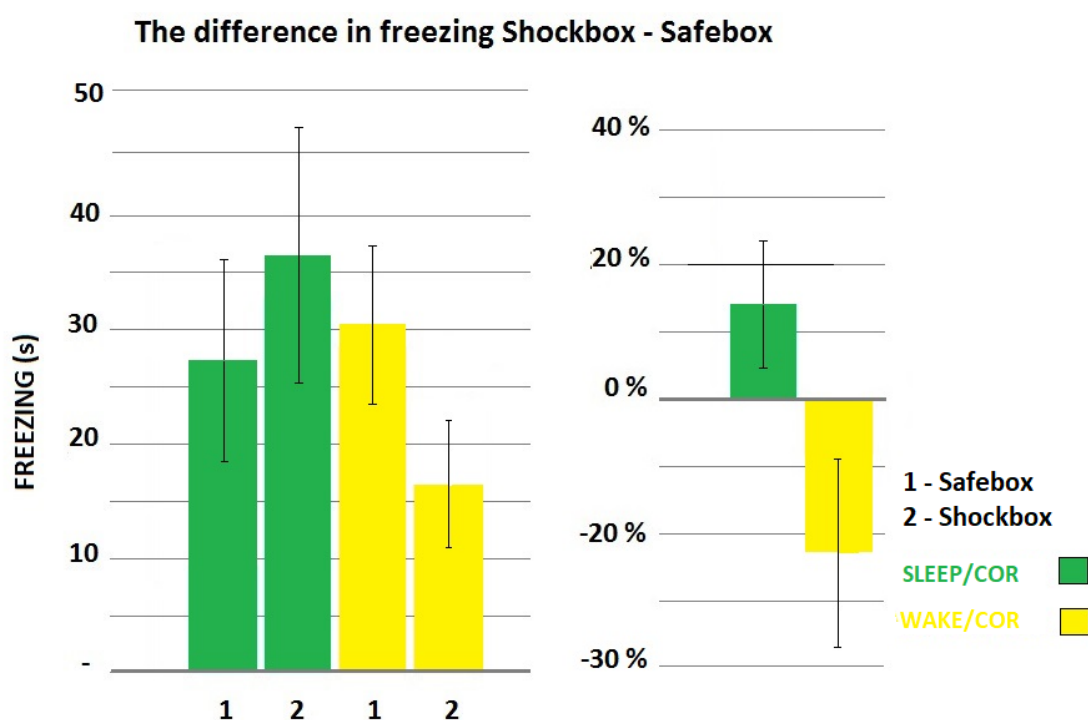
Graf 5 – Trend závislosti množství spánku na chování v „bezpečném“ prostředí u zvířat ze skupiny SLEEP/F.

### 5.3. Intrahipokampální injekce kortikosteronu potlačují pozitivní účinky spánku pro kontext traumatické události

Zvířata, která dostala dávku kortikosteronu a poté byla přesunuta do spánkové laboratoře (SLEEP/COR) nereagovala na jednotlivá prostředí signifikantně rozdílně (Graf 6) a freezovala jak v „bezpečném“ boxu ( $27,40 \pm 8,58$  s z 60 s, což odpovídá  $46 \pm 14$  %), tak i v „šokovacím“ ( $36,02 \pm 10,93$  s z 60 s, což odpovídá  $60 \pm 18$  %). Celkový rozdíl v chování v jednotlivých boxech činil  $14 \pm 10$  % ( $t_{(8)} = -0,55$ ,  $p = 0,59$ ).

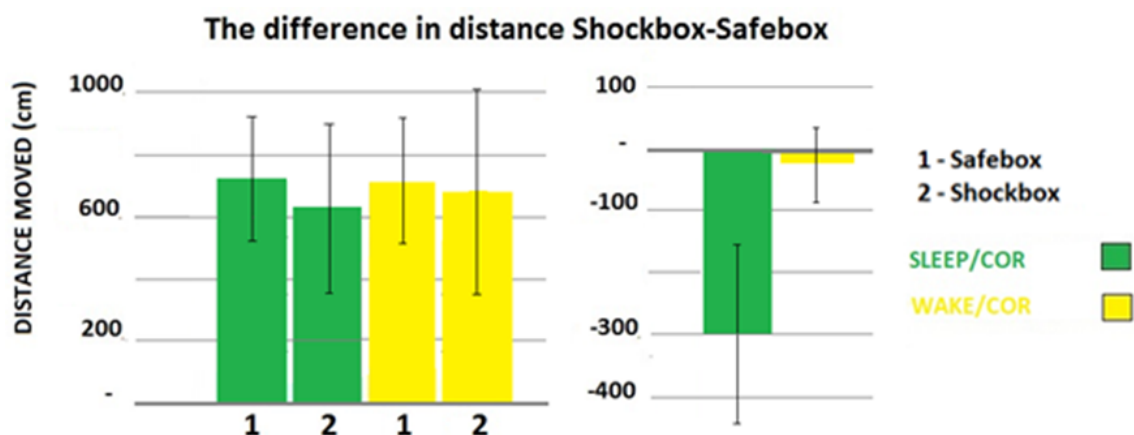
Skupina WAKE/COR, která byla spánkově deprivována a také dostala dávku kortikosteronu intrahipokampálně reagovala mírným, avšak nesignifikantním snížením freezingu ( $16,59 \pm 5,90$  s z 60 s, což odpovídá  $28 \pm 10$  %) oproti „bezpečnému“ boxu ( $30,11 \pm 7,5$  s z 60 s;  $50 \pm 12$  %;  $t_{(14)} = 1,33$ ,  $p = 0,2$ ).

Statistické porovnání hodnot procentuálního rozdílu freezingu v „šokovacím“ vs. „bezpečném“ boxech u skupin SLEEP/COR a WAKE/COR nebylo signifikantní ( $t_{(11)} = 1,73$ ,  $p = 0,11$ ).



**Graf 6 - Porovnání odpovědi jednotlivých skupin na jednotlivá prostředí.** Skupina SLEEP/COR nereaguje signifikantně na prostředí „bezpečného“ a „šokovacího“ boxu ( $t_{(8)} = -0,55$ ,  $p = 0,59$ ), ani skupina WAKE/COR ( $t_{(14)} = -0,49$ ,  $p = 0,63$ ). Procentuální hodnota freezingu v „šokovacím“ vs. „bezpečném“ boxu je dána rozdílem procentuálního zastoupení freezingu v prvních 60 s v prostředí. Čím je nižší hodnota rozdílu, tím je větší rozdíl v chování potkna v jednotlivém prostředí.

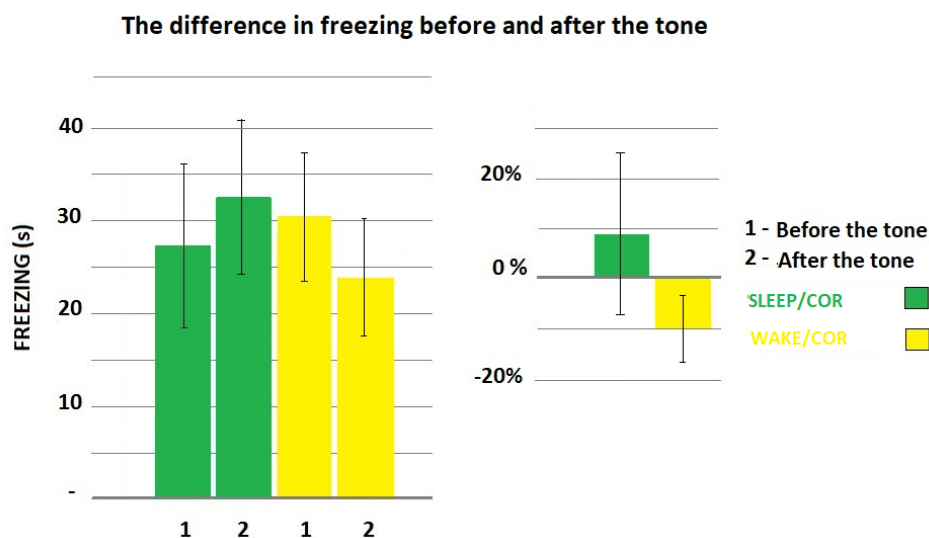




Graf 7 - Rozdíl v ušlé vzdálenosti po dobu prvních 60 s v jednotlivých prostředích u obou skupin. Na grafu nelze pozorovat signifikantní rozdíly v pohybu v různých boxech ani u skupiny SLEEP/COR ( $t_{(8)}=-0,37$ ,  $p=0,72$ ), ani u skupiny WAKE/COR ( $t_{(14)}=-0,049$ ,  $p=0,63$ ). Čím je nižší hodnota rozdílu v pravém grafu, tím je větší rozdíl v chování v jednotlivých boxech.

Podobných výsledků se dosáhlo při porovnání celkové ušlé dráhy (Graf 7). V „bezpečném“ boxu se skupina SLEEP/COR nepohybovala signifikantně více ( $719,51 \pm 207,71$  cm) oproti „šokovacímu“ boxu ( $630,82 \pm 265,87$  cm). Rozdíl v pohybu v jednotlivých boxech činil  $-293,7 \pm 153,38$  cm ( $t_{(8)}=-0,37$ ,  $p=0,72$ ). Spánkově deprivovaná skupina WAKE/COR se v obou boxech chovala podobně ( $708,11 \pm 213,33$  cm v „bezpečném“ a  $848,67 \pm 166,15$  cm v „šokovacím“) s celkovým rozdílem  $-27 \pm 60,87$  cm ( $t_{(14)}=-0,49$ ,  $p=0,63$ ). Statistické porovnání hodnot rozdílu v ušlé dráze v „šokovacím“ vs. „bezpečném“ boxech u skupin SLEEP/COR a WAKE/COR nebylo signifikantní ( $t_{(11)} = -0,65$ ,  $p = 0,53$ ).

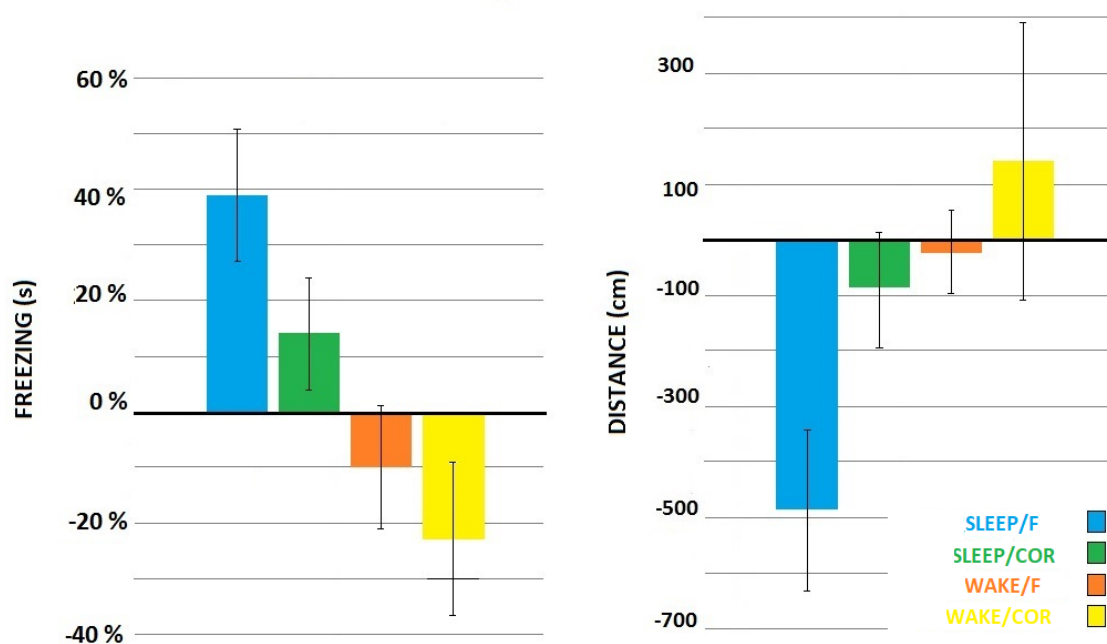
Při testování reakce potkanů na tón (Graf 8) ani jedna ze skupin nereagovala signifikantně. SLEEP/COR, která před tónem freezovala v „bezpečném“ boxu  $27,4 \pm 8,58$  s ( $46 \pm 14$  %), po tónu se freezing zvýšil jen minimálně –  $36,02 \pm 10,93$  s ( $60 \pm 18$  %), dle T-testu  $t_{(8)}=-0,41$ ,  $p=0,69$ . Stejně tak skupina WAKE/F freezovala před (před  $30,11 \pm 7,5$  s z 60 s ( $50 \pm 12$  %)) i po tónu  $16,59 \pm 5,9$  s z 60 s ( $28 \pm 10$  %). Mírné snížení ve freezingu není signifikantní ( $t_{(14)}=0,55$ ,  $p=0,59$ ). Statistické porovnání hodnot procentuálního rozdílu po vs. před tónem u skupin SLEEP/COR a WAKE/COR nebylo signifikantní ( $t_{(11)} = 1,33$ ,  $p = 0,21$ ).



**Graf 8 - - Porovnání odpovědi jednotlivých skupin na tón.** Ani jedna ze skupin nereaguje signifikantně: skupina SLEEP/COR - ( $t_{(8)}=-0,41$ ,  $p=0,69$ ), skupina WAKE/COR - ( $t_{(14)}=0,55$ ,  $p=0,59$ ). Procentuální hodnota freezingu v „bezpečném“ boxu po a před tónem je dána rozdílem procentuálního zastoupení freezingu za dobu 60 s po spuštění tónu. Čím je větší hodnota rozdílu, tím je větší odpověď skupin na tón.

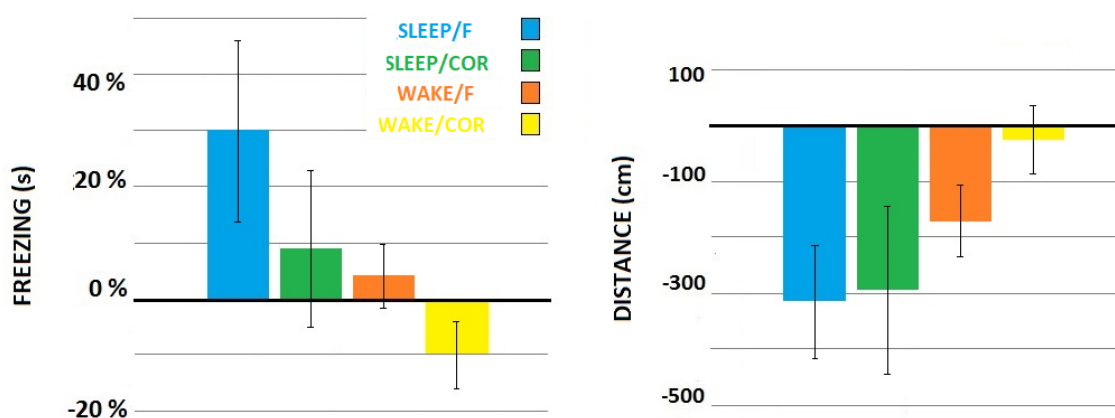
Výsledky lze shrnout do grafů, kde hlavním hodnotícím faktorem je rozdíl ve freezingu/vzdálenosti. V „šokovacím“ boxu a „bezpečném“ boxu (Graf 9) lze dle statistického vyhodnocení ANOVA pozorovat signifikantní vliv spánku ( $F(1,27)=10,08$ ,  $p=0,004$ ). Není prokázán vliv kortikosteronu ( $F(1,27)=2,22$ ,  $p=0,15$ ) ani interakce kortikosteronu a spánku ( $F(1,27) = 0,15$ ,  $p=0,7$ ). Při porovnání procentuálního rozdílu freezingu/vzdálenosti po vs. před tónem (Graf 10) lze opět potvrdit vliv spánku ( $F(1,27)=4,82$ ,  $p=0,037$ ). Není prokázán vliv kortikosteronu ( $F(1,27)=3,12$ ,  $p=0,09$ ) ani interakce kortikosteronu a spánku ( $F(1,27) = 0,07$ ,  $p=0,79$ ).

### The difference in freezing and distance Shockbox - Safebox



Graf 9 - Porovnání odpovědi jednotlivých skupin na jednotlivá prostředí. Dle statistického vyhodnocení ANOVA lze pozorovat signifikantní vliv spánku ( $F(1,27)=10,08$ ,  $p=0,004$ ). Není prokázán vliv kortikosteronu ( $F(1,27)=2,22$ ,  $p=0,15$ ) ani interakce kortikosteronu a spánku ( $F(1,27) = 0,15$ ,  $p=0,7$ ).

### The difference in freezing and distance before and after the tone



Graf 10-Porovnání odpovědi jednotlivých skupin na tón po podání intrahipokampální dávky kortikosteronu/fyziol. roztoku. Dle statistického vyhodnocení ANOVA lze pozorovat signifikantní vliv spánku ( $F(1,27)=4,82$ ,  $p=0,037$ ). Není prokázán vliv kortikosteronu ( $F(1,27)=3,12$ ,  $p=0,09$ ) ani interakce kortikosteronu a spánku ( $F(1,27) = 0,07$ ,  $p=0,79$ ).

## 6. Diskuze

Hlavní výsledkem této diplomové práce je zjištění potlačení pozitivních účinků spánku na konsolidaci paměti pro kontext traumatické události zvýšenou hladinou kortikosteronu v hipokampu. To, že spánek, přesněji jeho SWS fáze, má obecně pozitivní vliv na konsolidaci epizodické paměti, už bylo prokázáno v dřívějších studiích (více o tom v literárním přehledu). Nebylo však zcela zjištěno, jakým způsobem dochází k ovlivnění konsolidace paměti závislé na hipokampu při traumatické události. Proto byla vytvořena daná animální behaviorální studie.

Předpokládali jsme, že u skupiny SLEEP/COR dojde k ovlivnění ukládání kontextové paměti, což se nám potvrdilo. Naše hypotéza však byla taková, že dojde k celkovému snížení reakci na kontext (snížení freezingu v „šokovacím“ boxu). Místo toho se ukázalo, že zvířata nedokáží jednotlivé kontexty od sebe rozeznat (bezpečný od nebezpečného). Na „šokovací“ box reagují obdobně jako zvířata ze skupiny SLEEP/F – prostředí boxu neprozkoumávají, místo toho se zdržují v jednom místě a projevuje se charakteristické chování – freezing. Stejně tak ale reagují i na „bezpečný“ box. Na rozdíl od nich skupina SLEEP/F se daného (bezpečného) prostředí nebála a v prostoru boxu se pohybovala.

Další zajímavostí je signifikantně zvýšené množství SWS u skupiny SLEEP/COR. Obecně lze předpokládat, že čím více byla zastoupena fáze SWS v průběhu dvou hodin po tréninku, tím lépe budou zvířata schopna prostředí od sebe rozeznat. Zvýšené množství SWS u této skupiny však neneslo žádný pozitivní vliv spánku na konsolidaci paměti. Přestože trávila zvířata necelou polovinu celkového času spánkem, jejich chování v průběhu testování strachového podmiňování lze naopak přirovnat ke spánkově deprivovaným skupinám. Je zřejmé, že vysoké hladiny kortikosteronu v oblasti hipokampu negativně ovlivňují konsolidaci kontextové paměti a výsledné chování zvířat v obou kontextech.

Intrahipokampální injekce kortikosteronu způsobuje změny v paměťových procesech a navozuje tzv. PTSD-like memory. Po podání intrahipokampální dávky kortikosteronu by se mělo objevovat charakteristické chování pro PTSD. Zvířata přestávají reagovat na kontext (tato strachová odpověď je potlačena), místo toho reagují na jednoduchý podnět (tón) (Kaouane, a další 2012). Tato studie z roku 2012, která byla prováděna na myších a bez vlivu spánku, zaznamenala výskyt daného chování. Zvířata po podání kortikosteronu

přestávala reagovat na kontext, místo toho reagovala na CS (conditioned stimulus neboli tón), i přesto, že se jednalo o kontextové strachové podmiňování. V našem pokusu lze prokázat pouze signifikantní vliv spánku na CS reakci u skupiny SLEEP/F. Tato skupina nereagovala pouze na kontext, ale i na tón. Reakci ale nelze porovnat s jinými skupinami, neboť u ostatních skupin docházelo k silné odpovědi na „bezpečný“ kontext, které ostatní skupiny, ať už spánkově deprivované, nebo s podáním kortikosteronu, označovaly též za nebezpečný. Reakce na tón byla potlačena velmi silnou reakcí na kontext. Nelze tedy tvrdit, zda na jednoduchý podnět reagovaly, či nikoliv, ani porovnat výsledky skupiny SLEEP/F s ostatními skupinami.

Navíc odlišné chování může být způsobené změnou animálního modelu (my jsme používali místo myši laboratorní potkany). Použití potkanů bylo zvoleno z důvodu budoucího navázání elektrofyziologické části experimentu na behaviorální, ve které se kmen Long Evans používá nejčastěji.

### 6.1. Možný vliv kortikosteronu na množství SWS

Zmínila jsem, že intrahipokampální zvýšená koncentrace kortikosteronu má signifikantní vliv na množství SWS. Celkové zastoupení této fáze v průběhu dvou hodin nahrávání EEG po tréninku je vyšší než u potkanů, kterým byl injikován pouze fyziologický roztok. Lze pozorovat i rozdílné chování těchto dvou skupin. Potkani ze skupiny SLEEP/F se celkově více pohybují a jsou více vystresovaní po obdržení šoků během tréninku. Doba trvání zklidnění ve spánkovém boxu byla také mnohem delší, i když byli na daný box zvyklí dostatečně. Skupina SLEEP/COR byla skoro ihned po podání kortikosteronu mnohem klidnější, ospalejší – první pomalé vlny se objevovaly cca po 10 min strávených ve spánkovém boxu (u SLEEP/F byl ten čas mnohem delší – cca 30-45 min.).

Uvolňování glukokortikoidů při stresových reakcích je zprostředkováno HPA osou. Hormony se vážejí na své receptory v různých částech těla včetně mozku, mají tedy velmi široké působení. Jedna z hypotéz, proč se chování potkanů s dávkou kortikosteronu liší od těch kontrolních, je negativní zpětnovazebná inhibice sekrece hormonu. U skupiny SLEEP/COR s mnohem vyšší koncentrací kortikosteronu než u zvířat ze skupiny SLEEP/F může dojít k mnohem vyšší obsazenosti GR, neboť tyto receptory mají mnohem nižší

afinitu ke glukokortikoidům než MR, a proto jsou obsazeni až při velmi vysokých koncentracích hormonu. Zpětnovazebná inhibice je nejspíše zprostředkována právě daným typem receptorů (E. R. de Kloet, a další 1998). Tato zpětnovazebná smyčka je zprostředkována i negenomickou cestou, tudíž může být velmi rychlá. Existuje hypotéza, že glukokortikoidy se váží na své membránové receptory na neuronech PVN, a tím vyvolávají intracelulární kaskádu, která aktivuje syntézu endokanabinoidů. Ty pak způsobují presynaptickou inhibici uvolňování glutamátu a snižuje tím aktivitu parvocelulárních neuronů (Di, a další 2003). Na rozdíl od hypothalamu, v hipokampu působí glukokortikoidy na glutamatergní excitační synapse opačně. Zde se taky podílí membránové MR. Tento rychlý excitační hipokampální vzestup vede k rychlé zpětnovazebné aktivitě glukokortikoidů a dochází k inhibici HPA osy. Předpokládá se, že rychlá glukokortikoidy indukovaná synaptická aktivita hipokampálních eferentních drah bude mít inhibiční vstupy na hypothalamickou oblast v PVN (Boudaba, Szabó a Tasker 1996). Neurony z oblasti PVN přijímají aferentní vstupy z dorzálního hipokampu (Saphier a Feldman 1987). Stimulace hipokampu tedy vede k inhibici aktivity HPA osy (Casady a Taylor 1976).

## 6.2. Interakce mezi vlivem spánku a kortikosteronu při konsolidaci paměti pro prostorový kontext

Výzkum z roku 2014 (Kelemen, a další) se zaměřoval na interakci v průběhu konsolidace mezi hladinou glukokortikoidů a spánkem/bděním. Pro zjištění účinku na hipokampu závislé paměti používali zkoumání dvou objektů v otevřeném poli. Předpokládali, že účinky glukokortikoidů na konsolidaci paměti budou souviset se spánkem/bděním. Během 80 min spánku či bdění byla potkanům podána intrahipokampální dávka kortikosteronu. Při testování bylo zjištěno, že glukokortikoidy měly negativní vliv na konsolidaci na hipokampu závislé paměti při podání dávky v průběhu spánku, zatímco u potkanů, kteří byli spánkově deprivováni, došlo naopak k pozitivnímu vlivu na konsolidaci. U této skupiny došlo ke kompenzaci spánku vysokými hladinami kortikosteronu. Chování skupiny, která spala a dostala dávku kortikosteronu, se podobalo skupině spánkově deprivované s dávkou fyziologického roztoku. Intrahipokampální podání kortikosteronu narušilo ukládání paměti v průběhu spánku, ale v průběhu bdělosti došlo naopak ke zlepšení. Při porovnání daného

výzkumu s výsledky této diplomové práce lze s určitostí říct, že i chování skupiny SLEEP/COR se podobalo chování WAKE/F. Je tedy zřejmé, že intrahipokampální dávka kortikosteronu má negativní vliv na konsolidaci na hipokampu závislé paměti. U skupiny WAKE/COR jsme však nepotvrdili žádný kompenzační vliv vysokých hladin kortikosteronu.

Tyto rozdílné výsledky mohou souviset s designem experimentu. Zatímco ve výzkumu z roku 2014 se snažili minimalizovat endogenní zvýšení stresových hormonů v průběhu plnění úkolů i při spánkové deprivaci, v průběhu strachového podmiňování neprodleně muselo dojít k aktivaci HPA osy a produkci glukokortikoidů. Navíc v průběhu experimentu prezentovaného v této diplomové práci byl kortikosteron podáván ihned po ukončení tréninku bdělým potkanům. Zde ve studii byla intrahipokampální administrace kortikosteronu až v průběhu spánku. Rozdílná výsledná koncentrace hormonu mohla vést k odlišnému chování potkanů.

### 6.3. Signifikance studie pro problematiku PTSD

Jak už bylo zmíněno v literárním přehledu, život ohrožující situace (emocionálně zabarvené) se pamatují mnohem lépe než ty, které jsou emocionálně neutrální. U lidí může taková expozice vyvolat vznik až patologického stavu – posttraumatické stresové poruchy (PTSD). PTSD byla poprvé diagnostikována při výzkumech změn chování u vojáků po válce v Koreji a Vietnamu. K příznakům patří poruchy paměti, zahrnující částečnou amnézii traumatických kontextuálních podnětů a hypermnézii jednoduchých podnětů spojených s traumatickou událostí (např. zvukových a vizuálních stimulů), které nejsou v běžném životě považovány za hrozbu. Takové podněty mohou způsobovat hypersenzitivní odpovědi – nadměrně generalizovaný strach, úzkost, noční můry aj. Mozkové oblasti, které se podílejí na fungování paměti a reakci na stres jsou již dříve zmíněný hipokampus, amygdala a frontální kůra (Elzinga a Bremner 2002).

Pro objasnění biologických, neuronálních okolností vzniku PTSD, na vyvíjení a testování nových způsobů léčby jsou zapotřebí animální modely, neboť lidské studie jsou velmi omezené v prověření základní neurobiologie PTSD. K navození strachové odezvy se používá metoda strachového podmiňování, injekce kortikosteronu, stresového hormonu je zapotřebí k tomu, aby došlo k zesílení strachové reakce a k tvorbě traumatické paměti.

Hipokampus hraje důležitou roli pro ukládání kontextové paměti a předpokládá se, že je to právě to místo, kde by mohlo docházet k patologickým změnám v průběhu konsolidace. Náš pokus poukazuje na význam konsolidace paměti pro traumatickou událost. Výzkum molekulárních a neuronálních mechanismu by tak mohl objasnit příčiny vznikajících poruch paměti.

#### 6.4. Použití výsledků v dalším výzkumu

V další části experimentu bychom se chtěli zaměřit na jednotkové nahrávání hipokampálních neuronů (place cells) v průběhu strachového podmiňování (tréninku) i v době dvouhodinového intervalu po intrahipokampální injikaci. Naším cílem by bylo zaměřit se konsolidační procesy – na přehrávání hipokampální aktivity (tzv. hippocampal replay). Během přehrávání se aktivují stejné skupiny neuronů a ve stejném sledu jako při učení. Vlivem glukokortikoidů by ale mohlo docházet ke změnám průběhu přehrávání jednotlivých neuronů či skupin a mohlo by kvůli tomu docházet k narušení ukládání traumatické paměti.

Další experimenty by mohli změřit koncentrace glukokortikoidů a zjistit, zda opravdu dochází k inhibici prostřednictvím hipokampálních eferentních drah, či je mechanismus jiný.

### 7. Závěr

Díky této diplomové práci jsem se naučila základní behaviorální, elektrofyziologickou a farmakologickou metodiku: strachové podmiňování, výroba kanyl a konektorů, stereotaktické operace, nahrávání EEG spánku pomocí nahrávacího systému Axona, vyhodnocování jednotlivých spánkových fází, intrahipokampální administrace, práce v programech MatLab a Ethovision, základy statistických metod (T-test, ANOVA), základy histologických metod, aj.

Podařilo se nám prokázat, že intrahipokampální administrace kortikosteronu vede ke zhoršení konsolidaci kontextové paměti pro traumatickou událost v průběhu spánku a pozitivně ovlivňuje množství SWS v průběhu dvou hodin po strachovém podmiňování.



## 8. Reference

- Achermann, P., a A. A. Borbély. „Low-frequency (< 1 Hz) oscillations in the human sleep electroencephalogram.“ *Neuroscience* 81, č. 1 (1997): 213-222.
- Akers, Raymond F., David M. Lovinger, Patricia A. Colley, David J. Linden, a Aryeh Routenberg. „Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation.“ *Science* 231 (1986): 587-589.
- Amaral, D. G., H. Behniea, a J. L. Kelly. „Topographic organization of projections from the amygdala to the visual cortex in the macaque monkey.“ *Neuroscience* 118, č. 4 (2003): 1099-1120.
- Amorapanth, P., J. LeDoux, a K. Nader. „Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus.“ *Nature America Inc.* 3, č. 1 (2000): 74-79.
- Androutsellis-Theotokis, A., G. P. Chrousos, R. D. McKay, A. H. DeCherney, a Kino. T. „Expression profiles of the nuclear receptors and their transcriptional coregulators during differentiation of neural stem cells.“ *Horm Metab Res.* 45, č. 2 (2013): 159-168.
- Arnsten, A. F., a P.S. Goldman-Rakic. „Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys: evidence for a hyperdopaminergic mechanism.“ *Arch Gen Psychiatry* 55, č. 4 (1998): 362-368.
- Babinsky, R., a další. „The possible contribution of the amygdala to memory.“ *Behavioural Neurology* 6 (1993): 167-170.
- Bailey, D. J., J. E. Tetzlaff, J. M. Cook, X. He, a F. J. Helmstetter. „Effects of hippocampal injections of a novel ligand selective for the alpha 5 beta 2 gamma 2 subunits of the GABA/benzodiazepine receptor on Pavlovian conditioning.“ *Neurobiol Learn Mem.* 78, č. 1 (2002): 1-10.
- Barrett, Lisa Feldman. „Are emotions natural kinds?“ *Perspectives on Psychological Science* 1, č. 1 (2006): 28-58.
- Barria, Andres, Dominique Muller, Victor Derkach, Leslie C. Griffith, a Thomas R. Soderling. „Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptord by CaM-KII during long-term potentiation.“ *Science* 276 (1997): 2042-2045.
- Beckmann, Richard P., Lee A. Mizzen, a William J. Welch. „Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly.“ *Science*, 1990: 850-854.
- Benke, Tim A., Andreas Luthi, John T. R. Isaac, a Graham L. Collingbridge. „Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity.“ *Nature* 393 (1998): 793-797.
- Bliss, T. V., a T. Lomo. „Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthized rabbit following stimulation of the perforant path.“ *J Physiol* 232, č. 2 (1973): 331-356.

- Bolles, Robert C., a Michael S. Fanselow. „A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain.“ *The behavioral and brain sciences*, 1980: 291-323.
- Bostock, Elizabeth, Robert U. Muller, a John L. Kubie. „Experience-dependent modifications of hippocampal place cell firing.“ *Hippocampus* 1, č. 2 (1991): 193-206.
- Boudaba, C., K. Szabó, a J. G. Tasker. „Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus.“ *J Neurosci.* 16, č. 22 (1996): 7151-7160.
- Bradbury, Margaret J., Alison M. Strack, a Dallman Mary F. „Lesions of the hippocampal efferent pathway (fimbria-fornix) do not alter sensitivity of adrenocorticotropin to feedback inhibition by corticosterone in rats.“ *Neuroendocrinology* 58 (1993): 396-407.
- Brem, Anna-Katharine, Kathy Ran, a Alvaro Pascual-Leone. „Learning and memory.“ V *Handbook of Clinical Neurology*, 693-737. 2013.
- Burwell, Rebecca D., a David G. Amaral. „Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat.“ *The journal of comparative neurology*, 1998: 179-205.
- Buzsáki, Gyorgy. „Theta oscillations in the hippocampus.“ *Neuron* 33 (2002): 325-340.
- Cahill, Larry, a další. „Amygdala activity at encoding correlated with long-term, free recall of emotional information.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996): 8016-8021.
- Cahill, Larry, a další. „Sex-related difference in amygdala activity during emotionally influenced memory storage.“ *Neurobiology of Learning and Memory* 75 (2001): 1-9.
- Canli, Turhan, Zuo Zhao, John E. Desmond, Gary Glover, a John D. E. Gabrieli. „fMRI identifies a network of structures correlated with retention of positive and negative emotional memory.“ *Psychobiology* 27, č. 4 (1999): 441-452.
- Casady, R. L., a A. N. Taylor. „Effect of electrical stimulation of the hippocampus upon corticosteroid levels in the freely-behaving, non-stressed rat.“ *Neuroendocrinology* 20 (1976): 68-78.
- Castilio, Pablo E., Chiayu Q. Chiu, a Reed C. Carroll. „Long-term synaptic plasticity at inhibitory synapses.“ *Curr Opin Neurobiol.* 21, č. 2 (2012): 328-338.
- Cintra, A., a další. „Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system.“ *Neuroscience* 3 (1994): 843-897.
- Clark, K. B., D. C. Smith, D. L. Hassert, R. A. Browning, D. K. Naritoku, a R. A. Jensen. „Posttraining electrical stimulation of vagal afferents with concomitant vagal efferent inactivation enhances memory storage processes in the rat.“ *Neurobiology of Learning and Memory* 70 (1998): 364-373.

- Coan, E. J., A. J. Irving, a G. L. Collingridge. „Low-frequency activation of the NMDA receptor system can prevent the induction of LTP.“ *Neuroscience Letters* 105 (1989): 205-210.
- Cohen, Neal J., a Larry R. Squire. „Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that.“ *Science* 210 (1980): 207-210.
- Coleman-Mesches, K., a J. L. McGaugh. „Differential effects of pretraining inactivation of the right or left amygdala on retention of inhibitory avoidance training.“ *Behav Neurosci* 109, č. 4 (1995): 642-647.
- Collins, Stephen M. „Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance.“ *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (2001): 315-318.
- Dallman, Mary F., Nancy Levin, Caren S. Cascio, Susan F. Akana, Lauren Jacobson, a Robert W. Kuhn. „Pharmacological evidence that the inhibition of diurnal adrenocorticotropin secretion by corticosteroids is mediated via type I corticosterone-preferring receptors.“ *Endocrinology* 124, č. 6 (1989): 2844-2850.
- Dash, Michael B., Christopher L. Douglas, Vladyslav V. Vyazovskiy, Chiara Cirelli, a Giulio Tononi. „Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states.“ *Journal of Neuroscience* 29, č. 3 (2009): 620-629.
- Datta, Subimal. „Avoidance task training potentiates phases pontine-wave density in the rat: a mechanism for sleep-dependent plasticity.“ *The Journal of Neuroscience* 20, č. 22 (2000): 8607-8613.
- Davis, M., a P. J. Whalen. „The amygdala: vigilance and emotion.“ *Molecular Psychiatry*, 2001: 13-34.
- Davis, Michael, Janice M. Hitcock, Malcolm B. Bowers, Craig W. Berridge, Kathleen R. Melia, a Robert H. Roth. „Stress-induced activation of prefrontal cortex dopamine turnover: blockade by lesions of the amygdala.“ *Brain Research* 664 (1994): 207-210.
- Day, M., R. Langston, a R. G. M. Morris. „Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning.“ *Nature*, 2003: 205-209.
- de Kloet, E. R., E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl, a M. Joels. „Brain corticosteroid receptor balance in health and disease.“ *Endocrine Rev.* 19 (1998): 269-301.
- de Kloet, E. Ronald, Erno Vreugdenhil, Melly S. Oitzl, a Marian Joels. „Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease.“ *Endocrine Reviews*, 1998: 269–301.
- de Quervain, Dominique J.-F., Benno Roozendaal, a James L. McGaugh. „Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory.“ *Nature* 394 (1998): 787-790.
- Denis, Marc, Jan-Ake Gustafsson, a Ann-Charlotte Wikstrom. „Interaction of the M=90,000 heat shock protein with the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor.“ *The Journal of Biological Chemistry* 263, č. 34 (1988): 18520-18523.

- Destexhe, Alain, Stuart W. Hughes, Michelle Rudolph, a Vincenzo Crunelli. „Are corticothalamic UP states fragments of wakefulness?“ *Trends Neurosci.* 30, č. 7 (2007): 334-342.
- Di, S., R. Malcher-Lopes, K. C. Halmos, a J. G. Tasker. „Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism.“ *J Neurosci.* 23, č. 12 (2003): 4850-4857.
- Diamond, David M., M. Catherine Bennett, Monika Fleshner, a Gregory M. Rose. „Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation.“ *Hippocampus* 2, č. 4 (1992): 421-430.
- Diekelmann, Susanne, a Jan Born. „The memory function of sleep.“ *Nature Reviews* 11 (2010): 114-126.
- Dingledine, Raymond, Karin Borges, Derek Bowie, a Stephen F. Traynelis. „The glutamate receptor ion channels.“ *Pharmacological Reviews* 51, č. 1 (1999): 7-62.
- Diorio, Diane, Victor Viau, a Michael J. Meaney. „The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress.“ *The Journal of Neuroscience* 13, č. 9 (1993): 3839-3847.
- Dudek, Serena M., a Mark F. Bear. „Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992): 4363-4367.
- Dunn, J. D., a S. E. Orr. „Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation.“ *Experimental Brain Research* 54 (1984): 1-6.
- Dunwiddie, T. V., a G. Lynch. „The relationship between extracellular calcium concentrations and the induction of hippocampal long-term potentiation.“ *Brain Research* 169, č. 1 (1979): 103-110.
- Ehlers, M. D. „Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting.“ *Neuron* 28, č. 2 (2000): 511-525.
- Eichenbaum, H., P. Dudchenko, E. Wood, M. Sharipo, a H. Tanila. „The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space?“ *Neuron* 23, č. 2 (1999): 209-226.
- Elzinga, B. M., a J. D. Bremner. „Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)?“ *J Affect Disord* 70, č. 1 (2002): 1-17.
- Ergorul, Ceren, a Howard Eichenbaum. „The hippocampus and memory for "what", "where" and "when".“ *Learning and Memory* (11), 2004: 397-405.
- Favorik, A., L. M. Dupont, M. Arce, a H. Eichenbaum. „Medial prefrontal cortex supports recollection, but not familiarity, in the rat.“ *Journal of Neuroscience* 28, č. 50 (2008): 13428-13434.

- Feldman, S., a N. Conforti. „Effects of hypothalamic deafferentations on adrenocortical responses in the rat following hippocampal stimulation.“ *Experimental Brain Research* 44 (1981): 232-234.
- Feldman, Shaul, a Joseph Weidenfeld. „Electrical stimulation of the dorsal hippocampus caused a long lasting inhibition of ACTH and adrenocortical responses to photic stimuli in freely moving rats.“ *Brain Research* 911 (2001): 22-26.
- Fogel, Sturat M., Carlyle T. Smith, a Kimberley A. Cote. „Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems.“ *Behavioural Brain Research*, 2007: 48-61.
- Foy, Michael R., Mark E. Stanton, Seymour Levine, a Richard F. Thompson. „Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus.“ *Behavioral and Neural Biology* 48 (1987): 138-149.
- Fukunaga, Kohji, Luc Stoppinig, Eishichi Miyamoto, a Dominique Muller. „Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II.“ *The Journal of Biological Chemistry* 268, č. 11 (1993): 7863-7867.
- Furmark, T., H. Fischer, G. Wik, M. Larsson, a M. Fredrikson. „The amygdala and individual differences in human fear conditioning.“ *Neuroreport* 8, č. 18 (1997): 3957-3960.
- Gais, Steffen, a další. „Sleep transforms the cerebral trace of declarative memory.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 104, č. 47 (2007): 18778-18783.
- Galon, Jerome, a další. „Gene profiling reveals unknown enhancing and supressive actions of glucocorticoids on immune cells.“ *The FASEB Journal* , 2002: 61-71.
- Glaser, Ronald, a Janice Kiecolt-Glaser. „Stress damages Immune system and Health.“ *Discovery Medicine* 5, č. 26 (2005): 165-169.
- Goelet, Philip, Vincent F. Castellucci, Samuel Schacher, a Eric R. Kandel. „The long and the short of long-term memory - a molecular framework.“ *Nature* 322 (1986): 419-422.
- Gold, Paul E., a Roderick B. Van Buskirk. „Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injectons.“ *Behavioral Biology* 13 (1975): 145-153.
- Goodman, Yadong, Annadora J. Bruce, Bin Chneg, a Mark P. Mattson. „Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid  $\beta$ -peptide toxicity in hippocampal neurons.“ *Journal of Neurochemistry* 66, č. 5 (1996): 1836-1844.
- Goosens, Ki A., a Stephan Maren. „Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal and central amygdaloid nuclei in rats.“ *Learn Mem.* 8, č. 3 (2001): 148-155.
- Gould, Elizabeth, Anna Beylin, Patima Tanapat, Alison Reeves, a Tracey J. Shors. „Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation.“ *Nature Neuroscience* 2, č. 3 (1999): 260-265.

- Gould, Elizabeth, Bruce S. McEwen, Patima Tanapat, Liisa A. M. Galea, a Eberhard Fuchs. „Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation.“ *The Journal of Neuroscience* 17, č. 7 (1997): 2492-2498.
- Gould, Elizabeth, Patima Tanapat, Bruce S. McEwen, Gabriele Flugge, a Eberhard Fuchs. „Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998): 3168-3171.
- Groc, L., D. Choquet, a F. Chaouloff. „The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation.“ *Nat Neurosci* 11, č. 8 (2008): 868-870.
- Hafting, Torkel, Marianne Fyhn, Sturla Molden, May-Britt Moser, a Edvard I. Moser. „Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex.“ *Nature* 436 (2005): 801-806.
- Haché, Robert J. G., Raymond Tse, Terry Reich, Joanne G. A. Savory, a Yvonne A. Lefebvre. „Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor.“ *Journal of Biological Chemistry* 274, č. 3 (1999): 1432-1439.
- Hamann, Stephan B., Timothy D. Ely, Scott T. Grafton, a Clinton D. Kilts. „Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli.“ *Nature America Inc.* 2, č. 3 (1999): 289-293.
- Hammen, C., J. Davila, G. Brown, A. Ellicott, a M. Gitlin. „Psychiatric history and stress: predictors of severity of unipolar depression.“ *Journal of Abnormal Psychology* 101, č. 1 (1992): 45-52.
- Hardy, Matthew, P., a další. „Stress hormone and male reproductive function.“ *Cell Tissue Res* 322 (2005): 147-153.
- Harris, Eric W., Alan H. Ganong, a Carl W. Cotman. „Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors.“ *Brain Research* 323 (1984): 132-137.
- Hebb, Donald O. *The organization of behavior*. New York: Wiley&Sons, 1949.
- Herd, Alan J. „Cardiovascular response to stress.“ *Physiological Reviews* 71, č. 1 (1991): 305-330.
- Herman, J. P., C. M. Dolgas, a S. L. Carlson. „Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioral responses to cognitive stressors.“ *Neuroscience* 86, č. 2 (1998): 449-459.
- Herman, James P., a další. „Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness.“ *Frontiers in Neuroendocrinology* 24 (2003): 151-180.
- Hernandez, A. Ivan, a další. „Protein kinase Mζ synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase Cζ catalytic domain.“ *The Journal of Biological Chemistry* 278, č. 41 (2003): 40305-40316.

- Holaska, James M., Ben E. Black, Dona C. Love, John A. Hanover, John Leszyk, a Bryce M. Paschal. „Calreticulin is a receptor for nuclear export.“ *Journal of Cell Biology* 152, č. 1 (2001): 127-140.
- Holaska, James M., Ben E. Black, Fraydoon Rastinejad, a Bryce M. Paschal. „Ca<sup>2+</sup>-Dependent Nuclear Export Mediated by Calreticulin.“ *Molecular and Cell Biology* (22) 17 (2002): 6286–6297.
- Hsieh, Changchi, a další. „Persistent increased PKM $\zeta$  in long-term and remote spatial memory.“ *Neurobiol Learn Mem.* 138 (2017): 135-144.
- Huang, Yan-You, Asuncion Colino, David K. Selig, a Robert C. Malenka. „The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation.“ *Science* 225 (1992): 730-733.
- Huber, Reto, M. Felice Ghilardi, Marcello Massimini, a Giulio Tononi. „Local sleep and learning.“ *Nature* 430 (2004): 78-81.
- Hutchison, Kevin A., Kurt D. Dittmar, a William B. Pratt. „All of the factors required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with heat shock protein 90 are preassociated in a self-sufficient protein folding structure, a “foldosome.” .“ *The Journal of Biological Chemistry*, 1994: 27894-27899.
- Chrousos, George P., a Philip W. Gold. „The concepts of stress and stress system disorders.“ *Jama* 267, č. 9 (1992): 1244-1252.
- Isaac, J. T., R. A. Nicoll, a R. C. Malenka. „Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP.“ *Neuron* (15) 2 (1995): 427-434.
- Izquierdo, Iván, Jorge H. Medina, Monica R. M. Vianna, Luciana A. Izquierdo, a Daniela M. Barros. „Separate mechanisms for short- and long-term memory.“ *Behavioural Brain Research* 103 (1999): 1-11.
- Jahr, C. E., a C. F. Stevens. „Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons.“ *Nature* 325 (1987): 522-525.
- Kalantaridou, S. N., A. Makrigiannakis, E. Zoumakis, a G. P. Chrousos. „Stress and the female reproductive system.“ *Journal of reproductive immunology* 62 (2004): 61-68.
- Kaleem, Afshan, a další. „CREB in long-term potentiation in hippocampus: role of post-translation modifications-Studies in silico.“ *Journal of Cellular Biochemistry* 112 (2011): 138-146.
- Kaouane, Nadia, a další. „Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice.“ *Science* 335 (2012): 1510-1513.
- Karlsson, Mattias P., a Loren M. Frank. „Awake replay of remote experiences in the hippocampus.“ *Nat Neurosci.* 12, č. 7 (2009): 913-918.
- Karst, Henk, Stefan Berger, Gitta Erdmann, Günther Schütz, a Marian Joëls. „Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone.“ *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, č. 32 (2010): 14449-14454.

- Karst, Henk, Stefan Berger, Marc Turiault, Francois Tronche, Günther Schütz, a Marian Joëls. „Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, č. 52 (2005): 19204-19207.
- Kelemen, E., M. Barendt, J. Born, a M. Inostroza. „Hippocampal corticosterone impairs memory consolidation during sleep but improves consolidation in the wake state.“ *Hippocampus* 24, č. 5 (2014): 510-515.
- Keller-Wood, Maureen E., a Mary F. Dallman. „Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion.“ (Endocrine Reviews) 5, č. 1 (1984).
- Keller-Wood, Maureen E., a Mary F. Dallman. „Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion.“ *Endocrine Reviews* 5, č. 1 (1984): 1-24.
- Kemp, Nicola, a Zafar I. Bashir. „Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms.“ *Progress in Neurobiology* 65, č. 4 (2001): 339-365.
- Kerr, Steven D., Lee W. Campbell, Su-Yang Hao, a Philip W. Landfield. „Corticosteroid modulation of hippocampal potentials: increased effect with aging.“ *Science* 245 (1989): 1505-1509.
- Kim, J. J., a M. S. Fanselow. „Modality-specific retrograde amnesia of fear.“ *Science* 256, č. 5057 (1992): 675-677.
- Kim, Jeansok J., a Kenneth S. Yoon. „Stress: metaplastic effects in the hippocampus.“ *View Point* 21, č. 12 (1998): 505-509.
- Kino, T., M. U. De Martino, E. Charmandari, M. Mirani, a G. P. Chrousos. „Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes.“ *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003: 457-467.
- Kjelstrup, Kirsten G., Frode A. Tuvnes, Hill-Aina Steffenach, Robert Murison, Edvard I. Moser, a May-Britt Moser. „Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus.“ *PNAS*, 2002: 10825-10830.
- Knigge, Karl M. „Adrenocortical response to stress in rats with lesions in hippocampus and amygdala.“ (Limbic system and adrenocortical function) 108 (1961): 18–21.
- Knigge, Karl M., a Myron Hay. „Evidence of Inhibitive Role of Hippocampus in Neural Regulation of ACTH Release.“ *Proc Soc Exp Biol Med*, 1963: 67-69.
- Krettek, J. E., a J. L. Price. „A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections.“ *J. Comp. Neur.* 178 (1978): 255-28.
- Krugers, Harm J., Bas R. K. Douma, Gerda Andringa, Béla Bohus, Jakob Korf, a Paul G. M. Luiten. „Exposure to chronic psychosocial stress and corticosterone in the rat: effects on spatial discrimination learning and hippocampal protein kinase Cy immunoreactivity.“ *Hippocampus* 7 (1997): 427-436.



- LaBar, K. S., J. E. LeDoux, D. D. Spencer, a E. A. Phelps. „Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans.“ *J Neurosci* 15, č. 10 (1995): 6846-6855.
- LaBar, Kevin S., a Roberto Cabeza. „Cognitive neuroscience of emotional memory.“ *Nature Reviews* 7 (2006): 54-64.
- Landfield, P. W., J. C. Waymire, a G. Lynch. „Hippocampal Aging and Adrenocorticoids: Quantitative Correlations.“ *Science* 202 (1978): 1098-1102.
- LeDoux, J. E., J. Iwata, P. Cicchetti, a D. J. Reis. „Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear.“ *J Neurosci* 8, č. 7 (1988): 2517-2529.
- LeDoux, J. E., P. Cicchetti, A. Xagoraris, a L. M. Romanski. „The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning.“ *J Neurosci* 10, č. 4 (1990): 1062-1069.
- LeDoux, Joseph E. „Emotional memory systems in the brain.“ *Behavioural Brain Research* 58 (1993): 69-79.
- Lechner, Hilde A., Larry R. Squire, a John H. Byrne. „100 Years of consolidation—remembering Müller and Pilzecker.“ *Learning and Memory*, 1999.
- Lever, Colin, Tom Wills, Francesca Cacucci, Neil Burgess, a John O'Keefe. „Long-term plasticity in hippocampal place-cell representation of environmental geometry.“ *Nature* 416 (2002): 90-94.
- Lin, Ya-Tin, Yu-Lian Yu, Wei-Chen Hong, Ting-Shuan Yeh, Ting-Chun Chen, a Jin-Chung Chen. „NPFFR2 activates the HPA axis and induces anxiogenic effects in rodents.“ *J. Mol. Sci.* 18, č. 8 (2017).
- Ling, Douglas S. F., Larry S. Bernardo, a Todd C. Sacktor. „Protein kinase Mζ enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors.“ *Hippocampus* 16 (2006): 443-452.
- Lisman, John. „A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989): 9574-9578.
- Louie, Kenway, a Matthew A. Wilson. „Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep.“ *Neuron* 29 (2001): 145-156.
- Lu, Nick Z., a další. „International union of pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors.“ *Pharmacological Reviews* 58 (2006): 782-797.
- Luine, Victoria, Miriam Villegas, Carlos Martinez, a Bruce S. McEwen. „Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance.“ *Brain Research* 639 (1994): 167-170.

- Lupien, Sonia J., Bruce S. McEwen, Megan R. Gunnar, a Christine Heim. „Effects of stress throughout the lifespan on the brain. behaviour and cognition.“ *Neuroscience*, 2009: 434-445.
- Luscher, C., a další. „Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity.“ *Neuron* 24, č. 3 (1999): 649-658.
- Luscher, Christian, a Robert C. Malenka. „NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD).“ *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4, č. 6 (2012).
- Maren, S., G. Aharonov, a M. S. Fanselow. „Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats.“ *Behav Brain Res.* 88, č. 2 (1997): 261-274.
- Marik, Paul E., a Rinaldo Bellomo. „Stress hyperglycemia: an essential survival response.“ *Crit Care* 17, č. 2 (2013): 1-7.
- Marschner, Andreas, Raffael Kalisch, Bram Vervliet, Debora Vansteenwegen, a Christian Buchel. „Dissociable roles for the hippocampus and the amygdala in human cued versus context fear conditioning.“ *Journal of Neuroscience* 28, č. 36 (2008): 9030-9036.
- Mason, J. W. „17-hydroxycorticosteroid levels during electrical stimulation of the amygdaloid complex in conscious monkeys.“ *American Journal of Physiology*, 1959: 44-48.
- Matsuzaki, Masanori, Naoki Honkura, Graham C. R. Ellis-Davies, a Haruo Kasai. „Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines.“ *Nature* 429, č. 6993 (2004): 761-766.
- McEwen, Bruce S. „Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders.“ *Ann. NY Acad. Sci.* 1032 (2004): 1-7.
- McEwen, Bruce S. „Stress and Hippocampal Plasticity.“ *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999): 105-122.
- McNally, James G., Waltraud G. Muller, Dawn Walker, Ronald Wolford, a Gordon L. Hager. „The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells.“ *Science*, 2000: 1262-1265.
- Meaney, Michael J., a David H. Aitken. „[3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex.“ *Brain Research* 328 (1985): 176-180.
- Meibach, Richard C., a Allan Siegel. „Efferent connections of the hippocampal formation in the rat.“ *Brain Research* 124 (1977): 197-224.
- Mendel, Dirk B., a Eduardo Orti. „Isoform composition and stoichiometry of the 90-kDa heat shock protein associated with glucocorticoid receptors.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 1988: 6695-6702.

- Migues, Paola Virginia, a další. „PKM $\zeta$  maintains memories by regulating GLUR2-dependent AMPA receptors trafficking.“ *Nature Neuroscience* (13) 5 (2010): 630-634.
- Moghaddam, Bitá. „Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia.“ *Journal of Neurochemistry* (60) 5 (1993): 1650-1657.
- Molle, Matthias, Lisa Marshall, Steffen Gais, a Jan Born. „Grouping of spindle activity during slow oscillations in human non-rapid eye movement sleep.“ *Journal of Neuroscience* 22, č. 24 (2002): 10941-10947.
- Mulkey, R. M., C. E. Herron, a R. C. Malenka. „An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression.“ *Science* 261 (1993): 1051-1055.
- Nagerl, Valentin U., Nicola Eberhorn, Sidney B. Cambridge, a Tobias Bonhoeffer. „Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons.“ *Neuron* 44, č. 5 (2004): 759-767.
- Nair, Suresh M., Taco R. Werkman, Johanna Craig, Richard Finnell, Marian Joels, a James H. Eberwine. „Corticosteroid regulation of ion channel conductances and mRNA levels in individual hippocampal CA1 neurons.“ *Journal of Neuroscience* 18, č. 7 (1998): 2685-2696.
- Nasihatkon, Zohreh Sadat, a další. „Inhibitory effect of NMDA receptors in the ventral tegmental area on hormonal and eating behavior responses to stress in rats.“ *Behavioural Neurology*, 2014.
- Newton, Robert, a Neil S. Holden. „Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor?“ *Molecular Pharmacology* 72, č. 4 (2007): 799-809.
- Neyer, J. S. „Early adrenalectomy stimulates subsequent growth and development of the rat brain.“ *Exp. Neurol.* 82 (1983): 432-446.
- O'Reilly, R. C., a J. W. Rudy. „Conjunctive representations in learning and memory: principles of cortical and hippocampal function.“ *Psychol Rev.* 108, č. 2 (2001): 311-345.
- Ohman, A., A. Flykt, a F. Esteves. „Emotion drives attention: detecting the snake in the grass.“ *J Exp Psychol Gen.* 130, č. 3 (2001): 466-478.
- O'Keefe, J., a J. Dostrovsky. „The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat.“ *Brain Research* 34 (1971): 171-175.
- Packard, Mark G., Larry Cahill, a James L. McGaugh. „Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994): 8477-8481.
- Pagani, Massimo, a další. „Sympathovagal interaction during mental stress a study using spectral analysis of heart rate variability in healthy control subjects and patients with a prior myocardial infarction.“ *Circulation* 83, č. 4 (1991): 43-51.

- Patel, Paresh D., Juan F Lopez, David M. Lyons, Sharon Burke, Melissa Wallace, a Alan F Schatzberg. „Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain.“ *Journal of Psychiatric Research* 34 (2000): 383-392.
- Pavlidis, Constantine, Ogawa Sonoko, Akihisa Kimura, a Bruce S. McEwen. „Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices.“ *Brain Research* 738 (1996): 229-235.
- Phillips, R. G., a J. LeDoux. „Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning.“ *Behavioral Neuroscience* 106, č. 2 (1992): 274-285.
- Plihal, Werner, a Jan Born. „Effects of early and late nocturnal sleep on declarative and procedural memory.“ *Journal of Cognitive Neuroscience* 9, č. 4 (1997): 534-547.
- Porter, Nadia M., a Philip W. Landfield. „Stress hormones and brain aging: adding injury to insult.“ *Nature America Inc.* 1, č. 1 (1998): 3-4.
- Purves, D., GJ Augustine, D. Fitzpatrick, a et al. *Neuroscience. 2nd edition.* Sunderland (MA), 2001.
- Quinn, J. J., S. S. Oommen, G. E. Morrison, a M. S. Fanselow. „Post-training excitotoxic lesions of the dorsal hippocampus attenuate forward trace, backward trace, and delay fear conditioning in a temporally specific manner.“ *Hippocampus* 12, č. 4 (2002): 495-504.
- Redgate, E. S., a E. E. Fahringer. „A comparison of the pituitary adrenal activity elicited by electrical stimulation of preoptic, amygdaloid and hypothalamic sites in the rat brain.“ *Neuroendocrinology*, 1973: 334-343.
- Reul, J. M. H. M., a E. R. de Kloet. „Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.“ *Endocrinology* 117, č. 6 (1985): 2505-2511.
- Reul, Johannes, a Florian Holsboer. „Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression.“ *Current Opinion in Pharmacology* 2 (2002): 23-33.
- Richardson, Mark P., Bryan A. Strange, a Raymond J. Dolan. „Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions.“ *Nature neuroscience* 7, č. 3 (2004): 278-285.
- Robertson, Edwin M. „From creation to consolidation: a novel framework for memory processing.“ *PLoS Biol.*, 2009.
- Robinsin, L. „Stress and anxiety.“ *The Nursing Clinics of North America* 25, č. 4 (1990): 935-943.
- Rotenberg, A., a R. U. Muller. „Variable place-cell coupling to a continuously viewed stimulus: evidence that the hippocampus acts as a perceptual system.“ *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 352, č. 1360 (1997): 1505-1513.

- Rubin, Robert T., Arnold J. Mandell, a Paul H. Crandall. „Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: localization of stimulus sites.“ *Science* 153 (1966): 767-768.
- Sacktor, Todd C. „How does PKM $\zeta$  maintain long-term memory?“ *Nature Reviews* (12), 2011: 9-15.
- Sadeghi, Bahareh, Hedayat Sahraei, Homeira Zardooz, Hengameh Alibeik, a Nahid Sarahian. „Effects of intra-amygdala memantine infusion on metabolic symptoms induced by chronic stress in male NMRI mice.“ *Journal of Semnan University of Medical Sciences* 16, č. 3 (2015): 376-383.
- Sanchez, Edwin R., Lee E. Faber, William J. Henzel, a William B. Pratt. „The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins.“ *Biochemistry* 29 (1990): 5145-5152.
- Saphier, D., a S. Feldman. „Effects of septal and hippocampal stimuli on paraventricular nucleus neurons.“ *Neuroscience* 20, č. 3 (1987): 749-755.
- Sawchenko, P. E., a L. W. Swanson. „The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat.“ *The Journal of Comparative Neurology* 218 (1983): 121-144.
- Semon, Richard. *Mnemic Psychology*. London: George Allen & Unwin LTD, 1923.
- Senft, Rebecca A., Simone L. Meddle, a Alexander T. Baugh. „Distribution and abundance of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors throughout the brain of the great tit (*Parus major*).“ *PLOS ONE*, 2016: 1-11.
- Schwartz, James H., a Steven M. Greenberg. „Molecular mechanisms for memory: Second-messenger induced modifications of protein kinases in nerve cells.“ *Ann. Rev. Neurosci.* 10 (1987): 459-476.
- Siegel, Jerome M. „Sleep viewed as a state of adaptive inactivity.“ *Nature Reviews* 10 (2009): 747-753.
- Silverman, AJ, DL Hoffman, a Zimmerman EA. „The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus.“ *Brain Res Bull* 6 (1981): 47-61.
- Sirota, Anton, Jozsef Csicsvari, Derek Buhl, a Gyorgy Buzsáki. „Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents.“ *Proc Natl Acad Sci USA*. 100, č. 4 (2003): 2065-2069.
- Smith, David M., a Sheri J. Y. Mizumori. „Learning-related development of context-specific neuronal responses to places and events: the hippocampal role in context processing.“ *Journal of Neuroscience* 26, č. 12 (2006): 3154-3163.
- Sousa, N., N. V. Lukoyanov, M. D. Madeira, O. F. X. Almeida, a M. M. Paula-Barbosa. „Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement.“ *Neuroscience* 97, č. 2 (2000): 253-266.
- Squire, Larry R. „The legacy of patient H.M. for neuroscience.“ *Neuron* 61, č. 1 (2009): 6-9.

- Squire, Larry R., a Adam J. O. Dede. „Conscious and unconcious memory systems.“ *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7, č. 3 (2015).
- Squire, Larry R., Pamela C. Slater, a Paul M. Chace. „Retrograde amnesia: temporal gradient in very long term memory following electroconvulsive therapy.“ *Science* 187 (1975): 77-79.
- Steele, R. J., a R. G. M. Morris. „Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5.“ *Hippocampus* 9, č. 2 (1999): 118-136.
- Steinvorth, Sarah, Brian Levine, a Suzanne Corkin. „Medial temporal lobe structures are needed to re-experience remote autobiographical memories: evidence from H.M. and W.R.“ *Neuropsychologia* 43 (2005): 479-496.
- Stephens, Mary Ann C. „Stress and the HPA axis.“ *Alcohol Res.* 34, č. 4 (2012): 468-483.
- Steriade, M. „Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems.“ *Neuroscience* 137 (2006): 1087-1106.
- Stevens, Charles F., Susumu Tonegawa, a Yanyan Wang. „The role of calcium-calmodulin kinase II in three forms of synaptic plasticity.“ *Current Biology* 4 (1994): 687-693.
- Tabert, Matthias H., a další. „Deffirential amygdala activation during emotional decision and recognition memory tasks using unpleasant words: an fMRI study.“ *Neuropsychologia* 39 (2001): 556-573.
- Takashima, A., a další. „Declarative memory consolidation in humans:a prospective functional magnetic resonance imaging study.“ *PNAS* 103, č. 3 (2006): 756-761.
- Taube, Jeffrey S., Robert U. Muller, a James B Ranck. „Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rat. I. Description and quantitative analyses.“ *The Journal of Neuroscience* 10, č. 2 (1990): 420-435.
- Toni, Nicolas, Pierre-Alain Buchs, Irina Nikonenko, Patrisia Poviaitite, Lorena Parisi, a Dominique Muller. „Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation.“ *The Journal of Neuroscience* 21, č. 16 (2001): 6245-6251.
- Tononi, Giulio, a Chiara Cirelli. „Sleep function and synaptic homeostatis.“ *Sleep Medicine Reviews* 10 (2006): 49-62.
- Tucker, Mattew A., Yasutaka Hirota, Erin J. Wamsley, Hiuyan Lau, Annie Chaklader, a William Fishbein. „A daytime nap containing solely non-REM sleep enhances declarative but not procedural memory.“ *Neurobiology of Learning and Memory* 86 (2006): 241-247.
- Ullloor, Jagadish, a Subimal Datta. „Spatio-temporal activation of CREB, Arc and BDNF: a mechanism for pontine-wave generator activation-dependent two-way active-avoidance memory processing in the rat.“ *Journal of Neurochemistry* 95 (2005): 418-428.

- Vale, Wylie, Joachim Spiess, Catherine Rivier, a Jean Rivier. „Characterization of a 41-Residue Ovine Hypothalamic Peptide that Stimulates Secretion of Corticotropin and  $\beta$ -Endorphin.“ *Science* 213 (1981): 1394–1397.
- Valenzuela, C.A., a další. „Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic mechanisms through two different nonoverlapping pathways in the skeletal muscle of a teleost fish.“ *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 314, č. 1 (2018): 102-113.
- Vazdarjanova, Almira, a James L. McGaugh. „Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 95, č. 25 (1998): 15003-15007.
- Vyazovskiy, Vladyslav V., Chiara Cirelli, Martha Pfister-Genkow, Ugo Faraguna, a Giulio Tononi. „Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep.“ *Nature Neuroscience* 11, č. 2 (2008): 200-208.
- Walder, D. J., E. F. Walker, a R. J. Lewine. „Cognitive functioning, cortisol release, and symptom severity in patients with schizophrenia.“ *Biol Psychiatry* 48, č. 12 (2000): 1121-1132.
- Wallace, Andrew D., a John A. Cidlowski. „Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 2001: 42714-42721.
- Watanabe, Yoshifumi, Elizabeth Gould, a Bruce S. McEwen. „Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons.“ *Brain Research* 588 (1992): 341-345.
- Weaver, Ian C. G., a další. „Epigenetic programming by maternal behavior.“ *Nature Neuroscience* 7, č. 8 (2004): 847-854.
- Whalen, Paul J., Scott L. Rauch, Nancy L. Etcoff, Sean C. McInerney, Michael B. Lee, a Michael A. Jenike. „Masked presentations of emotional facial expressions modulate amygdala activity without explicit knowledge.“ *Journal of Neuroscience* 18, č. 1 (1998): 411-418.
- Wikipedia. 18. duben 2018. <https://cs.wikipedia.org/wiki/Emoce> (přístup získán 19. říjen 2018).
- Wilson, Matthew A., a Bruce L. McNaughton. „Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep.“ *Science* 265 (1994): 676-679.
- Witter, Menno P., Floris G. Wouterlood, Pieterke A. Naber, a Theo Van Haerten. „Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network.“ *Annals New York Academy of Sciences*, 2000: 1-24.
- Yang, Jun, Jimin Liu, a Donald B. DeFranco. „Subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors in vitro: chromatin recycling and nuclear export.“ *Journal of Cell Biology* 137, č. 3 (1997): 523-538.
- Yao, Yudong, a další. „PKM $\zeta$  maintains late-LTP by NSF/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPARs.“ *J Neurosci* (28) 31 (2008): 7820-7827.

Young, S. L., D. L. Bohenek, a M. S. Fanselow. „NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure.“ *Behav Neurosci* 108, č. 1 (1994): 19-29.